

APTASENSOREN FÜR KLEINE MOLEKÜLE  
ANHAND DES BEISPIELS 25-HYDROXY-VITAMIN D<sub>3</sub>

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
**Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigte Dissertation

von

Marc Prante, M. Sc.

[2021]

Referent:

Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Institut für Technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent:

apl. Prof. Dr. rer. nat. Sascha Beutel

Institut für Technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 19.04.2021

---

## Zitat

*„Man merkt nie, was schon getan wurde, man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.“*

Marie Curie (1867-1934)

---

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit der Promotion in seinem Arbeitskreis am Institut für Technische Chemie Hannover bedanken. Ein besonderes Dankeschön auch an PD. Dr. Sascha Beutel und PD Dr. Ulrich Krings für die Übernahme des Korreferats bzw. des Prüfungsvorsitzes.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Johanna Walter für ihre große Hilfsbereitschaft. So konnte ich während der letzten Jahre jederzeit mit meinen Fragestellungen zu Dir kommen und nach einem aufbauenden Gespräch erschienen die Probleme in einem anderen Licht. Durch deine tolle fachliche Unterstützung konnte die Arbeit erst in dieser Form entstehen. Auch ein weiteres großes Dankeschön für das Korrekturlesen dieser Dissertation!

Bei Dr. Christian Ude möchte ich mich für die exzellente Betreuung während meiner Masterarbeit bedanken. Auch darüber hinaus warst Du bei jeder Fragestellung sehr hilfsbereit und konntest neue Denkanstöße liefern.

Bei Alina Eilers und Torsten Schüling möchte ich mich für das geballte MST-Fachwissen bedanken. Ihr habt mir sehr oft weitergeholfen und ich werde unsere Aptamerexpertenrunde immer im Gedächtnis behalten.

Auch die Abende mit dem Brauteam und die dazugehörigen Brauwettbewerbe haben immer viel Spaß gemacht und waren auch von Erfolg gekrönt. Natürlich nur Dank der Expertise des Braumeisters.

Meinem alten Büro 163 möchte ich ebenfalls danken. Ihr habt mich während meiner Masterarbeit herzlich empfangen und ich habe mich sehr wohl bei euch gefühlt. So fiel mir der Umzug in mein neues Büro 265 gar nicht so leicht, wie ihr vielleicht denkt. Meine Zeit im Büro 265 war von fröhlichen und langen Abenden geprägt, für welche ich mich bei euch allen bedanken möchte. Auch abseits der Abendveranstaltungen habe ich die Zeit mit euch im Büro sehr genossen und ihr werdet mir alle sehr fehlen. Auch bei dem Büro 261 möchte ich mich bedanken, eure Tür (und Tasse) war stets für mich offen und ich habe sehr gerne Zeit mit euch verbracht. Bei Tobias Steinwedel möchte ich mich für die Begleitung seit des Studiums bedanken. Ob Lernrunden, Breaking Bad schauen oder Take 5 - mit Dir hatte ich immer eine Menge Spaß! Dem gesamten Institut danke ich für die schönen Jahre und der angenehmen Arbeitsatmosphäre, die dank euch entstanden ist.

Abschließend möchte ich meinen Eltern Andrea und Jörg Prante danken. Ihr habt mich immer bedingungslos in jeder Lebenslage unterstützt. Ohne euch Euch wäre ich nie so weit gekommen und dafür danke ich Euch vom ganzen Herzen.

---

## Kurzfassung

Substanzen mit einem geringen Molekulargewicht ( $< 900$  Da) werden als kleine Moleküle klassifiziert und sind in der Natur und im menschlichen Körper allgegenwärtig. Kleine Moleküle können in der Umwelt gefunden werden, in der sie als Sekundärmetabolite von einer Vielzahl von Pilzen, Bakterien und Pflanzen produziert werden. Im menschlichen Körper spielen kleine Moleküle im Stoffwechsel, wie beispielsweise bei der Signaltransduktion oder bei regulatorischen Prozessen, ebenfalls eine wichtige Rolle. Da kleine Moleküle sowohl in der Natur als auch im menschlichen Körper allgegenwärtig sind, entstand in den letzten Jahrzehnten ein verstärktes Interesse an der Überwachung dieser Substanzen auch in der diagnostischen Umgebung. Der Nachweis des kleinen Moleküls 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D) wurde in der Literatur ausführlich erforscht. 25(OH)D ist der Hauptmarker für die Vitamin-D-Versorgung im Stoffwechsel. Eine Vitamin-D Insuffizienz wird mit einem erhöhten Risiko für Krebs- und Knochenerkrankungen in Verbindung gebracht. Die derzeitigen Nachweismethoden dieses Moleküls, mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und Immunoassays, sind zeitaufwendig, teuer und erfordern geschultes Personal.

In dieser Arbeit wurde ein neuartiger Detektionsansatz unter Verwendung eines hochspezifischen gegen 25(OH)D gerichteten Aptamers etabliert, der auf der Target-Induzierten-Dissoziation (TID)-Methode basiert. Die Dissoziation eines komplementären, markierten Oligonukleotids bei der Targetbindung durch das Aptamer führt zu einer Signalabnahme, die proportional zum Analyten ist. Zunächst wurde das 25(OH)D-bindende Aptamer hinsichtlich der strukturellen Eigenschaften sowie der Bindungsaffinität untersucht. Anschließend wurden komplementäre Oligonukleotide basierend auf der Aptamerstruktur entworfen. Die Oligonukleotide wurden in Microscale Thermophorese- (MST) und Microarray-Experimenten evaluiert, um die optimale Oligonukleotidsequenz für eine maximierte Verdrängung zu identifizieren. In weiteren Microarrayexperimenten wurde anschließend das Aptamer auf einer Oberfläche immobilisiert und überprüft, ob der Immobilisierungsprozess die Bindungsfunktionalität des Aptamers beeinträchtigt. Abschließend wurde der neuartige TID-Assay hinsichtlich der Nachweisgrenze (LOD), Bestimmungsgrenze (LOQ) und Sensitivität charakterisiert. Der Assay für die 25(OH)D-Detektion konnte das kleine Molekül erfolgreich mit einer LOD von 32 nM in Puffer nachweisen, womit er eine ähnliche Sensitivität wie kommerziell erhältliche Assays zeigte. Die LOQ wurde mit 109 nM in Aptamerbindepuffer bestimmt.

Schlagwörter: *Aptamer, Aptamer-Microarray, TID-Assay, 25-Hydroxy-Vitamin D, 25(OH)D*

---

## Abstract

Substances with a low molecular weight ( $< 900$  Da) are classified as small molecules and are ubiquitous in nature and in the human body. Small molecules can be found in the environment where they are produced as secondary metabolites by a variety of fungi, bacteria, and plants. In the human body, small molecules also play important roles in metabolism, such as signal transduction and regulatory processes. Since small molecules are ubiquitous in nature as well as in the human body, an increased interest in monitoring these substances in the diagnostic environment has emerged in the last decades. Detection of the small molecule 25-hydroxy vitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D) has been extensively explored in the literature. 25(OH)D is the main biomarker of metabolic vitamin D supply. Vitamin D insufficiency has been associated with an increased risk of cancer and bone disease. Current detection methods of this molecule, using high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and immunoassays, are time consuming, expensive, and require trained personnel.

In this work, a novel detection approach using a highly specific aptamer directed against 25(OH)D was established based on the Target-Induced Dissociation (TID) method. Dissociation of a complementary, labeled oligonucleotide upon target binding by the aptamer results in a signal change proportional to the analyte. First, the 25(OH)D-binding aptamer was studied in terms of structural properties as well as binding affinity. Then, complementary oligonucleotides were designed based on the aptamer structure. The oligonucleotides were evaluated in MicroScale Thermophoresis (MST) and microarray experiments to identify the optimal oligonucleotide sequence for maximized displacement. Further microarray experiments were then performed to immobilize the aptamer on a surface and verify whether the immobilization process affected the binding functionality of the aptamer. Finally, the novel TID assay was characterized in terms of limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), and sensitivity. The assay for 25(OH)D detection successfully detected the small molecule with a LOD of 32 nM in buffer. LOQ was determined at 109 nM in aptamer binding buffer.

**Keywords:** *aptamer, aptamer microarray, TID-Assay, detection small molecule, 25(OH)D, detection 25(OH)D*

---

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
AuNP	Gold-Nanopartikel
CD-Spektroskopie	Circulardichroismus-Spektroskopie
CE	Capillary Electrophoresis
CHL	Chloramphenicol
CR	Competitive Replacement
CYP450	Cytochrom-P450-Hydroxylase
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FDA	Federal Drug Administration
FIS	Faradaische Impedanzspektrometrie
G-Quadruplex	Guanin-Quadruplex
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
$K_d$	Dissoziationskonstante
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MST	MicroScale Thermophoresis
nt	Nucleotide Length
OTA	Ochratoxin A
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
POCT	Point-Of-Care Testing
QGRS	Quadruplex Forming G-Rich Sequences
RFU	Relative Fluorescence Units
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
SNR	Signal-To-Noise Ratio
SPR	Surface Plasmon Resonance

---

TID	Target-Induced Dissociation
TISS	Target-Induced Structural Switch
VDBA14	Vitamin-D Binding Aptamer
VDBP	Vitamin-D Binding Protein
25(OH)D	25-Hydroxy-Vitamin D <sub>3</sub>



# Inhaltsverzeichnis

Zitat . . . . .	I
Danksagung . . . . .	II
Kurzfassung . . . . .	III
Abstract . . . . .	IV
Abkürzungsverzeichnis . . . . .	V
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>2</b>
<b>3. Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
3.1. Kleine Moleküle . . . . .	3
3.1.1. Definition . . . . .	3
3.1.2. Detektion von kleinen Molekülen . . . . .	4
3.1.3. 25-Hydroxy-Vitamin D als Gesundheitsmarker . . . . .	5
3.1.4. Biosensoren . . . . .	7
3.2. Aptamere . . . . .	7
3.2.1. Struktur . . . . .	8
3.2.2. Selektion . . . . .	8
3.2.3. Charakterisierung . . . . .	9
3.3. Aptasensoren . . . . .	9
3.3.1. Aptasensor-Designs . . . . .	10
3.3.2. Aktueller Stand von Aptasensoren für die Detektion von kleinen Molekülen	14
3.3.3. Herausforderungen bei der Entwicklung von Aptasensoren für kleine Moleküle . . . . .	15
3.4. Aptasensoren in Point-Of-Care-Anwendungen . . . . .	18
<b>4. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>20</b>
4.1. Charakterisierung von VDBA14 . . . . .	20
4.1.1. Strukturelle Eigenschaften von VDBA14 . . . . .	20
4.1.2. Untersuchung der Affinität von VDBA14 . . . . .	26
4.1.3. Untersuchung der Spezifität von VDBA14 . . . . .	31

4.2.	Entwicklung von komplementären Oligonukleotiden für den TID-Assay . . . . .	33
4.2.1.	Design der komplementären Oligonukleotide . . . . .	34
4.2.2.	Verdrängung der komplementären Oligonukleotide durch 25(OH)D . . .	37
4.3.	Immobilisierung von VDBA14 im Microarray-Format . . . . .	41
4.3.1.	Immobilisierung . . . . .	41
4.3.2.	Immobilisierungsoberfläche . . . . .	43
4.3.3.	Immobilisierungskonzentration . . . . .	45
4.3.4.	Funktionalität von VDBA14 nach Immobilisierung . . . . .	49
4.4.	Entwicklung eines kompetitiven TID-Assays . . . . .	54
4.4.1.	Verwendung von Spacern . . . . .	54
4.4.2.	Einfluss des Oligonukleotids auf die Verdrängungseffektivität . . . . .	58
4.4.3.	Inkubationsreihenfolge . . . . .	61
4.4.4.	Optimierte Bedingungen des TID-Assays . . . . .	64
4.5.	Detektion von 25(OH)D im kompetitiven TID-Assay . . . . .	65
4.5.1.	Detektion von nanomolaren 25(OH)D-Konzentrationen im kompetitiven TID-Assay . . . . .	65
4.5.2.	Signal-zu-Rausch-Verhältnis . . . . .	68
4.5.3.	Bestimmung der unteren Messgrenzen (LOQ, LOD) . . . . .	69
4.5.4.	Kompetitiver TID-Assay in Humanserum . . . . .	70
4.5.5.	Materialkosten des TID-Assays pro analysierter Probe . . . . .	71
4.5.6.	Vergleich des entwickelten TID-Assays mit dem Stand der Technik . . . .	73
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>75</b>
<b>A.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>B.</b>	<b>Materialien</b>	<b>91</b>
B.1.	Aptamere . . . . .	91
B.2.	Cy5-markierte Oligonukleotide . . . . .	91
B.3.	Verbrauchsmaterialien . . . . .	91
B.4.	Laborgeräte . . . . .	92
B.5.	Software . . . . .	93
B.6.	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	93
B.7.	Puffer und Lösungen . . . . .	94

<b>C. Methoden</b>	<b>95</b>
C.1. CD-Spektroskopie . . . . .	95
C.2. MST-Experimente . . . . .	95
C.2.1. VDBA14-25(OH)D-Interaktion . . . . .	95
C.2.2. VDBA14-25(OH)D-Interaktion in Humanserum . . . . .	96
C.2.3. VDBA14-Oligonukleotid Hybridisierungen . . . . .	96
C.2.4. TID-Assay . . . . .	96
C.3. Microarray-Experimente . . . . .	97
C.3.1. Immobilisierung von VDBA14 auf der Microarrayoberfläche . . . . .	97
C.3.2. SYBR Green I/II-Färbung . . . . .	97
C.3.3. Untersuchung der Aptamerfunktionalität nach Immobilisierung . . . . .	98
C.3.4. Einfluss des Puffers auf die Immobilisierung . . . . .	98
C.3.5. Einfluss der Spacerlänge auf die Immobilisierung . . . . .	99
C.3.6. Einfluss der Spacerlänge auf die Verdrängung des Oligonukleotids . . . . .	99
C.3.7. Einfluss des komplementären Oligonukleotids auf TID-Effektivität . . . . .	100
C.3.8. Einfluss der Inkubationsreihenfolge auf TID-Effektivität . . . . .	101
C.3.9. Bestimmung der Sensitivität . . . . .	102
C.3.10. Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze . . . . .	102
C.4. Berechnungen . . . . .	102
C.4.1. Berechnung SNR . . . . .	102
C.4.2. Berechnung Verdrängung . . . . .	103
C.4.3. Berechnung LOQ, LOD . . . . .	103
<b>D. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>104</b>
<b>E. Tabellenverzeichnis</b>	<b>106</b>
<b>F. Unterstützende Arbeiten</b>	<b>107</b>
<b>G. Lebenslauf</b>	<b>108</b>
<b>H. Publikationen und Konferenzbeiträge</b>	<b>109</b>

# 1. Einleitung

Niedermolekulare Verbindungen, auch kleine Moleküle (Small Molecules) genannt, spielen trotz ihres Namens eine große Rolle in unserem täglichen Leben. Zu dieser Klasse von Molekülen zählen natürlich vorkommende Stoffe wie Mykotoxine aus Pilzen, sowie vom Menschen produzierte Stoffe wie beispielsweise Arzneimittel und Antibiotika [1–3]. Auch im Körper natürlich vorkommende Stoffklassen wie Zucker, Lipide, Aminosäuren oder Alkaloide zählen zu den kleinen Molekülen. Durch die allgegenwärtige Anwesenheit von kleinen Molekülen in Lebensmitteln, Umwelt und dem menschlichen Körper wird stetig an neuen Detektionsmethoden für diese Molekülklasse gearbeitet. Neben der Verwendung von etablierten Detektionsmethoden, wie der Chromatographie oder Massenspektrometrie, bietet sich auch der Einsatz von Biosensoren an [4]. *In-vitro*-selektierte Oligonukleotide, auch Aptamere genannt, besitzen eine Reihe von Charakteristika, wodurch sie sich für die Verwendung als Biorezeptor in einem solchen Biosensor anbieten. Aptamere sind durch ihre komplexe dreidimensionale Faltung in der Lage auch besonders kleine Moleküle mit einer hohen Affinität zu binden [5, 6]. Antikörper sind aufgrund ihrer Größe und Unbeweglichkeit häufig nicht in der Lage diese Stoffklasse mit einer hohen Affinität zu binden, sodass Aptamere eine ideale Alternative darstellen [7]. Ein weiterer Vorteil von Aptameren ist der kostengünstigere Herstellungsprozess und die hohe Stabilität auch in harschen Reaktionsbedingungen.

Für die Detektion dieser gesundheitlich relevanten, kleinen Molekülen im medizinischen Bereich werden häufig Immunosensoren eingesetzt, so auch bei der Detektion des kleinen Moleküls 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D) [8, 9]. 25(OH)D ist ein integraler Bestandteil des Vitamin D-Stoffwechsels und wird als Hauptmarker für den Nachweis der Vitamin D-Versorgung eines Individuums verwendet. Ein niedriger Vitamin D-Status ist mit einem erhöhten Risiko für Krebs, Knochenerkrankungen und Infekten assoziiert [10]. Besonders Europäer zeigen eine niedrige Vitamin D-Versorgung, sodass die Belastungen des Gesundheitssystems durch die daraus resultierenden Krankheiten auf mehrere Milliarden Euro im Jahr beziffert wurden [11]. Im Jahr 2016 wurde die Vitamin D-Defizienz von Europäern sogar als pandemieartig bezeichnet [12]. Durch die gesundheitlichen Folgen, die mit einer Vitamin D-Defizienz einhergehen, werden stetig neue Detektionsmethoden von 25(OH)D erforscht. Besonders patientennahe Diagnostik (Point-Of-Care-Testing, POCT) ist eine zukunftsfähige Methode, welche eine schnelle, kostengünstige und lokale Analyse des Gesundheitsmarkers ermöglicht. Für diesen POCT-Ansatz bieten sich besonders Aptamere an.

## 2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Detektion von 25(OH)D. Dafür sollen aptamerbasierte Detektionsmethoden verwendet werden, da sich mit Hilfe von Aptameren eine Vielzahl von Assaydesigns realisieren lassen. Diese hohe Flexibilität der Assaygestaltung ist bei der Verwendung von Antikörpern nicht gegeben. In der Literatur wurde 2017 erstmals ein Aptamer beschrieben, welches mit einer hohen Affinität 25(OH)D bindet. Dieses Aptamer wird im Folgenden als VDBA14 bezeichnet (Vitamin D Binding Aptamer 14). Auf Grundlage dieser Entdeckung wurde in der vorliegenden Arbeit ein Assay für den Nachweis des kleinen Moleküls entwickelt, optimiert und evaluiert. Die Serumkonzentration von 25(OH)D liegt in der späteren diagnostischen Anwendung der Detektion des 25(OH)D-Spiegels im Blut im niedrigen nanomolaren Bereich (50 nM bis 150 nM), sodass daraus besonders hohe Anforderungen an die Sensitivität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze resultieren.

Zur Detektion des kleinen Moleküls wird ein optischer, fluoreszenzbasierter Assay entwickelt. Das Assayprinzip beruht auf der Verdrängung von, zum Aptamer komplementären, Oligonukleotiden. Die Oligonukleotide sollen in der vorliegenden Arbeit konzeptualisiert, charakterisiert und anschließend in dem Assayformat zum Nachweis von 25(OH)D erprobt werden. Für den Assay wird das Aptamer auf einer Oberfläche immobilisiert, weshalb die Auswirkung der Immobilisierung auf das Aptamer ausführlich evaluiert wird. Die Immobilisierung wird hinsichtlich Aptamerfunktionalität, Signalstärke und Signal-To-Noise-Ratio (SNR) optimiert. Abschließend soll der entwickelte 25(OH)D-Assay mit dem aktuellen Stand der Technik hinsichtlich Nachweis-, Bestimmungsgrenze und Preis verglichen werden.

## 3. Theoretische Grundlagen

### 3.1. Kleine Moleküle

#### 3.1.1. Definition

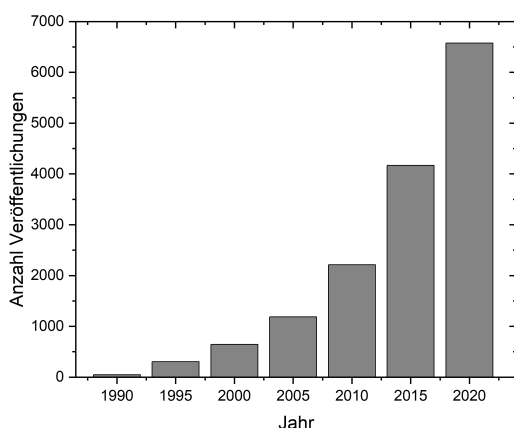
Kleine Moleküle, die sich durch ein niedriges Molekulargewicht ( $<900$  Dalton) auszeichnen, sind organische Verbindungen, die biologische Prozesse regulieren können. Im englischen werden sie mit dem feststehenden Begriff *Small Molecules* beschrieben. Zu den kleinen Molekülen zählen natürlich vorkommende niedermolekulare Verbindungen wie z.B. Mykotoxine, welche häufig als Lebensmittelkontaminanten auftreten können. Viele dieser Kontaminanten werden von Fadenpilzen produziert und weisen ein breites Spektrum potenziell schädlicher Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit auf. Die am häufigsten vorkommenden und toxischsten Mykotoxine sind Aflatoxine (produziert von *Aspergillus*-Arten), Ochratoxine (produziert von *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten) und Fusarientoxine (produziert von über 50 Fusarien-Arten)[13, 14].

Neben diesen natürlich vorkommenden Verbindungen sind viele kleine Moleküle anthropogen. Dazu gehören die polychlorierten Biphenyle (PCB), welche bis zu den 1980er Jahren in industriellen Anwendungen weit verbreitet waren. Im Jahr 1980 erfolgte ein Verbot von PCBs in weitestgehend allen Ländern, da diese Verbindungen ein erhebliches toxisches Potenzial bei Tieren und Menschen aufweisen. Weiterhin können diese kleinen Moleküle nicht auf natürliche Weise abgebaut werden und verweilen so über Jahre in der Umwelt [15, 16]. Kleine Moleküle werden auch als Pestizide in der Landwirtschaft eingesetzt. Das bekannteste kleine Molekül, welches als Pestizid eingesetzt wird, ist Glyphosat. In den vergangenen Jahren wurde dieser Stoff aufgrund seiner potentiell karzinogenen Wirkung in den Medien ausführlich diskutiert [17, 18]. Doch nicht nur natürlich vorkommende Mykotoxine oder Pestizide können in der Umwelt gefunden werden auch. Auch Pharmazeutika, welche aus der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken sind, werden als Schadstoffe durch menschliche Ausscheidungen in die Natur eingebracht. Die am häufigsten analysierten Pharmazeutika in der Umwelt sind Antibiotika, gefolgt von Analgetika und Hormonen. Von 713 weltweit analysierten Wasserproben wurden in 631 Proben Rückstände von Pharmazeutika detektiert, welche in die Umwelt ausgeschieden wurden und dort erheblichen Schaden anrichten [19]. Auch bei der natürlichen Regulation des Stoffwechsels im Körper spielen kleine Moleküle eine wichtige Rolle. Vitamine, Hormone, Botenstoffe und Kofaktoren beinhalten eine Reihe von kleinen Molekülen, die den

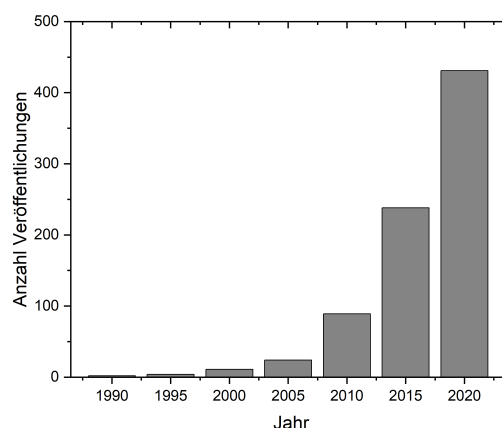
Stoffwechsel regulieren. Diese dienen dadurch häufig als Anhaltspunkt für bestimmte Krankheitsbilder und werden deshalb detektiert. Durch die allgegenwärtige Natur der kleinen Moleküle wurde sowohl den oben genannten Gesundheitsmarkern, als auch vielen anderen kleinen Molekülen in den vergangenen Jahren verstärktes Forschungsinteresse entgegen gebracht.

### 3.1.2. Detektion von kleinen Molekülen

Das ständig wachsende Interesse an der Überwachung von kleinen Molekülen in der Umwelt, sowie im menschlichen Körper, führte zu einem steigenden Interesse an der Entwicklung einer Vielzahl von Sensoren für den Nachweis dieser Moleküle. Aufgrund ihrer allgegenwärtigen Natur und ihrer wichtigen Funktionen ist die Quantifizierung von kleinen Molekülen von hohem Interesse. In den letzten 30 Jahren wurden 6574 Forschungsartikel veröffentlicht, die sich mit kleinen Molekülen befassen. Das Interesse an der Grundlagenforschung von kleinen Moleküle hat sich stetig gesteigert (Abb. 3.1a) , wohingegen die Forschung an Detektionsmethoden für kleine Molekülen in den Jahren 2005-2010 einen merkbaren Sprung gemacht hat (Abb. 3.1b).



(a) Publierte Artikel über kleine Moleküle



(b) Publierte Artikel über die Detektion von kleinen Molekülen

**Abb. 3.1.:** Publikationen der letzten 30 Jahre mit kleinen Molekülen als Thematik. Web of Science Suche, Stichwort Small Molecules, Zugriff 26.10.20. **(a)** Anzahl publizierter Artikel über kleine Moleküle von 1990 bis 2020. Die Anzahl wurde kumulativ aufgetragen. **(b)** Anzahl publizierter Artikel über die Detektion von kleinen Moleküle von 1990 bis 2020. Die Anzahl wurde kumulativ aufgetragen.

Speziell die Detektion von gesundheitlich relevanten kleinen Molekülen, auch Gesundheitsmarker genannt, wurde in den letzten Jahren verstärkt erforscht. Dabei wurden neuartige

Detektionsmethoden für Hormone, wie beispielsweise Testosteron oder Progesteron entwickelt. Aber auch Messmethoden für Vitamine wie beispielsweise 25(OH)D wurden publiziert [4, 20, 21].

### 3.1.3. 25-Hydroxy-Vitamin D als Gesundheitsmarker

Vor 50 Jahren gelang dem Forscher John Haddad, Jr. ein Durchbruch bei der Erforschung des Vitamin D-Metabolismus, indem er einen kompetitiven Proteinbindungs-Assay (CBPA) entwickelte. Mit diesem Assay war es zum ersten Mal möglich, 25(OH)D in Blutplasma zu detektieren [22]. Diese Entdeckung führte zu einem verstärkten Interesse an der Erforschung des Vitamin D-Metabolismus. In den Folgenden Jahren konnte so auch der Biosyntheseweg von Vitamin D aufgeklärt werden. Der Biosyntheseweg von Vitamin D beginnt in der Epidermis. Dort wird 7-Dehydrocholesterol durch UV-B-Strahlung durch eine Spaltung des B-Ringes zu Prä-Vitamin-D<sub>3</sub> umgesetzt [10, 23]. Dieses Zwischenprodukt ist thermoinstabil und isomerisiert anschließend zu Vitamin D<sub>3</sub>, welches proteingebunden zur Leber transportiert wird. Der Transport wird durch das Vitamin-D-bindende Protein (VDBP) vermittelt. Vitamin D<sub>3</sub> ist stark hydrophob, was diesen proteingebundenen Transport nötig macht [23]. Lediglich ca. 1 % des Vitamin D<sub>3</sub> im Körper zirkuliert in seiner freien Form [9, 24]. In der Leber wird Vitamin D<sub>3</sub> mithilfe der Cytochrom-P450-Hydroxylasen an der C<sub>25</sub>-Position hydroxyliert und es entsteht 25(OH)D. Dieses kleine Molekül aus dem Vitamin D-Stoffwechsel kommt im Körper in der höchsten Konzentration vor [10, 23]. Nachdem 25(OH)D in der Niere erneut hydroxyliert wurde, entsteht das bioaktive Produkt Calcitriol. Für die vollständige Vitamin-D-Biosynthese siehe Abb. 3.2.

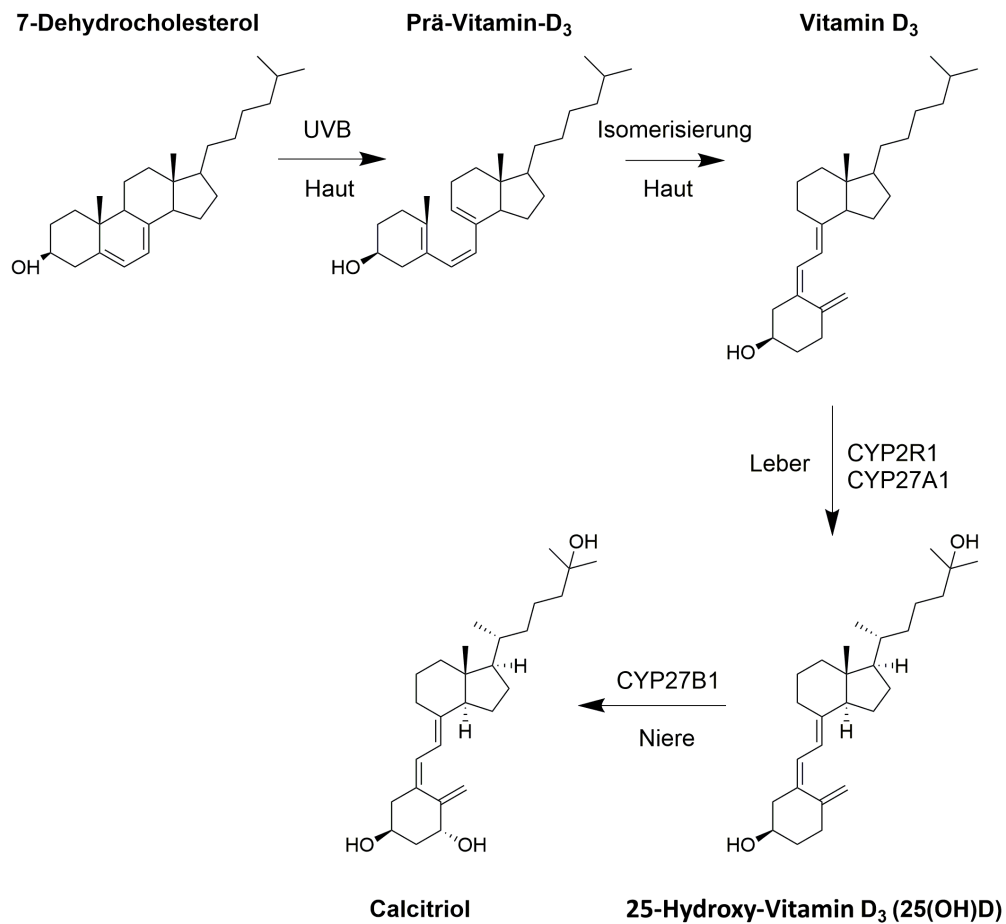
Der Vitamin D-Status eines Patienten wird durch die Konzentration von 25(OH)D festgestellt, da dieses Molekül in der höchsten Konzentration vorkommt und auch die größte Halbwertszeit aller Vitamin D-Zwischenstufen besitzt. Durch die Entwicklung chromatographischer Methoden wurde der ursprüngliche Detektionsassay von J. Haddad verworfen und 25(OH)D wurde hauptsächlich chromatographisch mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Massenspektrometrie (LC-MS) detektiert. Auch die Verwendung von nicht-chromatographischen Methoden wie Radioimmunoassays wurde etabliert.

Für den Nachweis von 25(OH)D werden heutzutage eine Vielzahl von Methoden verwendet. HPLC, LC-MS und Immunoassays sind die am weitesten verbreiteten Methoden zum Nachweis von 25(OH)D, wobei die LC-MS/MS als die sensitivste Methode gilt. Normale 25(OH)D-Werte variieren zwischen 100 nM und 150 nM. Konzentrationen unter 75 nM erhöhen das Risiko für Knochenerkrankungen wie Osteoporose und Rachitis drastisch [25]. Zu den Hauptproblemen



beim Nachweis von 25(OH)D gehören unterschiedliche Testergebnisse zwischen verschiedenen Nachweismethoden [26]. Darüber hinaus stellen niedrige 25(OH)D-Konzentrationen im Blut eine zusätzliche Herausforderung bei der Entwicklung neuer Nachweismethoden dar. Die Nachweismethode muss zwischen Konzentrationen von 0 nM und 150 nM 25(OH)D auf reproduzierbare Weise durchgeführt werden können [25].

Die 25(OH)D-Messmethode mittels Immunoassay basiert auf der Affinität von Antikörpern und 25(OH)D. Dadurch ist der Immunoassay im weitesten Sinne ein sogenannter Biosensor, da eine biologische Komponente auf den Analyten reagiert. Biosensoren erfüllen häufig die oben genannten Anforderungen für die sensitive Bestimmung von verschiedensten Analyten, da sie auf affinitätsbasierten Interaktionen beruhen.



**Abb. 3.2.:** Biosynthese von Vitamin D. 7-Dehydrocholesterol wird in der Epidermis durch UV-B-Strahlung im B-Ring aufgebrochen, sodass das instabile Prä-Vitamin D<sub>3</sub> entsteht. Durch Isomerisierung entsteht anschließend Vitamin D<sub>3</sub>, welches durch zwei Hydroxylierungsschritte durch die Cytochrom-P450-Hydroxylasen (CYP450) zu 25(OH)D hydroxyliert wird. Durch die Hydroxylierung an der C1-Position durch die mitochondriale 1 $\alpha$ -Hydroxylase entsteht das bioaktive 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol).

### 3.1.4. Biosensoren

Biosensoren sind bioanalytische Geräte, welche ein biologisches Element (z.B. Zellen, Antikörper, Enzyme oder Oligonukleotide [27]) enthalten. Dieses biologische Element reagiert selektiv mit dem zu untersuchenden Zielmolekül. Die daraus resultierenden Änderungen im System (beispielsweise in der Struktur des biologischen Elements) werden durch einen Transducer in ein messbares Signal umgewandelt. Der erste Einsatz eines Biosensors, über den Clark und Lyons 1962 berichteten, diente dem Nachweis und der Quantifizierung der Glukosekonzentration im Blut. Das Enzym Glucoseoxidase wurde auf einer semipermeablen Membran immobilisiert, die eine Sauerstoffelektrode umhüllte. Die Abnahme der gemessenen Sauerstoffkonzentration wurde dann direkt mit der Glukosekonzentration korreliert [28]. Durch die Entdeckung der Aptamere in 1990, boten diese neuen, hochselektiven Biomoleküle eine neue Möglichkeit in der Anwendung der Biosensorik. Auch in der 25(OH)D-Analytik spielen Biosensoren eine wichtige Rolle, da eine der etablierten Detektionsmethoden die Verwendung von Antikörpern umfasst. Eine neuartige Alternative zu der Verwendung von Antikörpern stellen Aptamere dar, welche im nachfolgenden Abschnitt betrachtet werden.

## 3.2. Aptamere

Aptamere wurden 1990 zum ersten Mal beschrieben und als vielversprechende Alternative zu Antikörpern gehandelt [29, 30]. In den nachfolgenden 30 Jahren konnte diese neue Klasse von Oligonukleotiden ausgiebig getestet werden. Aptamere zeichnen sich durch eine hohe Affinität zu ihrem Target aus. Weiterhin sind sie stabil in harschen chemischen Bedingungen und können, im Gegensatz zu Antikörpern, einfach regeneriert und wiederverwendet werden. Aptamere können sowohl therapeutisch, als auch diagnostisch eingesetzt werden. Das bekannteste therapeutische Aptamer Macugen von Pfizer wurde 2004 von der FDA zur Behandlung der neovaskulären altersbedingten Makuladegeneration (AMD) zugelassen. Weitere anti-angiogene Aptamere zur Behandlung der AMD (Zimura, Fovista und Pegnivacogin) befinden sich derzeit in fortgeschrittenen klinischen Studien [31]. Therapeutische Aptamere für die Behandlung von Nierenerkrankungen befinden sich ebenfalls in fortgeschrittenen klinischen Studien [32]. In der Diagnostik könnten Aptamere beispielsweise die Antikörpern in Immunoassays ersetzen, da sie ähnlich hohe Affinitäten aufweisen und wesentlich günstiger zu produzieren sind.

### 3.2.1. Struktur

Aptamere sind Oligonukleotide, welche eine Reihe von Sekundär- und Tertiärstrukturen einnehmen können. Die Sekundärstruktur von Aptameren wird durch Wasserstoffbrückenbindungen und Watson-Crick-Basenpaarungen ausgebildet. Die daraus resultierenden Sekundärstrukturen umfassen verschiedene Loop-, sowie eine Mischung aus Loop und Stem-Strukturen [32–34]. Die Sekundärstruktur eines Aptamers wird maßgeblich durch die Abfolge der Nukleinsäuren definiert. Diese Sekundärstrukturen interagieren ebenfalls miteinander und bilden durch Van-der-Waals-Interaktionen und elektrostatische Wechselwirkungen die Tertiärstrukturen aus. Zu den Tertiärstrukturen zählen typische A-, B- und Z-Form DNA-Strukturen. Komplexe Tertiärstrukturen wie Pseudoknot- oder G-Quadruplex-Strukturen werden durch Metallionen stabilisiert [20, 35]. Die positiv geladenen Metallionen koordinieren zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen des Zucker-Phosphatrückgrates eine Bindung [36]. Durch die Interaktion zwischen Sekundär- und Tertiärstrukturen entsteht die dreidimensionale Faltung des Aptamers, welches in der Lage ist, das Target zu erkennen und zu binden. Durch die Beeinflussung der Tertiärstruktur durch verschiedene Pufferbedingungen kann so die Aptamer-Target-Bindung positiv, aber auch negativ beeinflusst werden. Daher sollte bereits bei der Selektion des Aptamers der Puffer an die spätere Anwendung angepasst werden und in der späteren Anwendung der Selektionspuffer verwendet werden, da dieser die idealen Bedingungen für eine korrekte Aptamerfaltung und Aptamerfunktion darstellt.

### 3.2.2. Selektion

Eine als SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) bezeichnete Selektionstechnik für Oligonukleotide führte im Jahr 1990 zur Entdeckung der Aptamere [29, 30]. Während des SELEX-Prozesses wird eine Bibliothek von bis zu  $10^{18}$  Oligonukleotidsequenzen dem gewünschten Zielmolekül ausgesetzt. Ein geringer Prozentsatz der Sequenzen der Bibliothek bindet an das Zielmolekül und wird anschließend vom nichtbindenden Rest abgetrennt. Die bindenden Sequenzen werden anschließend mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und der Selektionsprozess wird 8-15 mal wiederholt [20]. Um die Selektivität des Aptamers zu erhöhen, kann eine Gegenselektion durchgeführt werden (Zugabe molekularer Strukturen, die dem Zielmolekül ähnlich sind). Die Sequenzen, die nur an das Zielmolekül, nicht aber an das Analogon binden, werden entfernt. Nachdem die Aptamere selektiert wurden, erfolgt der Charakterisierungsschritt um ihre Bindungsspezifität zu bestimmen. [6, 20, 37]

### 3.2.3. Charakterisierung

Wenn neue Aptamere über die SELEX selektiert werden, ist eine wichtige Charakterisierungskennzahl die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ). Je niedriger die  $K_d$ , desto höher ist die Affinität des Aptamers zum jeweiligen Zielmolekül. Es gibt eine Vielzahl von Methoden zur Bestimmung der  $K_d$ . Spektroskopiebasierte Methoden, massensensitive Methoden und trennungsbasierte Methoden werden hauptsächlich eingesetzt [38]. Zur Bestimmung der  $K_d$  wird entweder das Aptamer oder das Zielmolekül gegen das jeweils andere Molekül titriert.  $K_d$ -Bestimmungsmethoden können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Immobilisierung eines Bindungspartners (entweder Aptamer oder Target) oder immobilisierungsfreie Methoden. Immobilisierungsbasierte Methoden umfassen die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), bei der ein Partner immobilisiert wird und die  $K_d$  gemessen wird. Zu den immobilisationsfreien Methoden gehören die Isothermal Titration Calorimetry (ITC), die Kapillarelektrophorese (CE) und die MicroScale Thermophoresis (MST) [39]. Ein wesentlicher Nachteil der immobilisierungsbasierten Methoden ist die Veränderung der chemischen Struktur des Aptamers oder Targets bei der Immobilisierung mit chemischen Linkern. Dadurch kann die Aptamer-Target-Affinität beeinflusst werden, was sich in einer veränderten  $K_d$  zeigt. Generell sollte die Charakterisierungsmethode so gewählt werden, dass sie der späteren Anwendung des Aptamers entspricht. Für diagnostische Zwecke, bei denen sich eine Immobilisierung des Aptamers anbietet, sollten also immobilisierungsbasierte Methoden angewendet werden, um eine Annäherung an die reale  $K_d$  zu ermöglichen.

## 3.3. Aptasensoren

Durch den Einsatz von Aptameren in Biosensoren und den daraus resultierenden Aptasensoren eröffnen sich eine Reihe von Vorteilen gegenüber der klassischen Verwendung von Antikörpern. Aptamere werden chemisch mit hoher Reproduzierbarkeit und niedrigen Kosten im Vergleich zu Antikörpern synthetisiert und sind über einen breiten Temperatur- und pH-Bereich sowie in organischen Lösungsmitteln stabil [6, 20, 37]. Die Aptamere in Aptasensoren liegen häufig immobilisiert vor, da dies die Handhabung des Aptasensors stark verbessert, sowie die Aptamere dadurch einfacher regeneriert werden können [40]. Mit dem wachsenden Interesse an der Detektion von kleinen Molekülen ist es nicht verwunderlich, dass auch die Entwicklung von Aptasensoren für die Detektion von kleinen Molekülen in den letzten Jahren verstärkt wurde. Speziell bei der Detektion von kleinen Molekülen stechen Aptasensoren durch eine Reihe von Vorteilen heraus.

### 3.3.1. Aptasensor-Designs

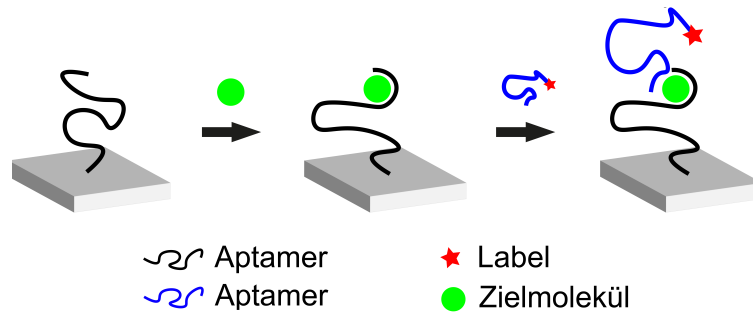
Einer der Hauptvorteile von Aptasensoren sind eine Vielzahl von möglichen Assaydesigns, welche besonders für die Detektion von kleinen Molekülen mit Antikörpern nicht möglich wären. So kann die Bindung des kleinen Moleküls an das Aptamer häufig nicht direkt gemessen werden, da die Größe und Masse des Moleküls zu gering ist. Durch die Verwendung von verschiedenen Assaydesigns lassen sich jedoch trotzdem Aptasensoren für die Detektion dieser Moleküle realisieren. Die Aptamere werden dafür häufig kovalent auf einer Oberfläche immobilisiert, was die Assay-Durchführung enorm erleichtert. Das Design von Aptasensoren kann in vier Methoden unterteilt werden: Sandwich-Design, Target-induzierte Strukturveränderung (TISS), Target-induzierte Dissoziation (TID) und Kompetitive Bindung. Diese Methoden werden im Folgenden erläutert.

#### **Sandwich-Design**

Ähnlich dem Konzept der Enzym-Immunoassay-Tests (ELISA) wurden für Aptasensoren Sandwich-ähnliche Nachweismethoden etabliert. Das Aptamer wird auf einer Oberfläche immobilisiert und bindet an sein Zielmolekül, wobei ein zweites Aptamer an eine andere Bindungsstelle des Zielmoleküls bindet, sodass eine Sandwich-Struktur entsteht (siehe Abb. 3.3). Dieses Design kann mit zwei Aptameren, die gegen verschiedene Epitope des Ziels gerichtet sind, oder in gemischten Ansätzen unter Verwendung eines Aptamers und eines Antikörpers realisiert werden. Das niedermolekulare Progesteron konnte in einem Sandwich-ähnlichen Assay mit einer Nachweisgrenze LOD von 5 nM unter Verwendung immobilisierter Aptamere nachgewiesen werden [41]. Für die Detektion von kleinen Molekülen ist dieses Design eingeschränkt verwendbar, da kleine Moleküle wenig strukturelle Erkennungselemente besitzen. Darüber hinaus ist es aufgrund der geringen Größe des Zielmolekül wahrscheinlich, dass es zu einer sterischen Hinderung zwischen den beiden bindenden Aptameren kommen kann.

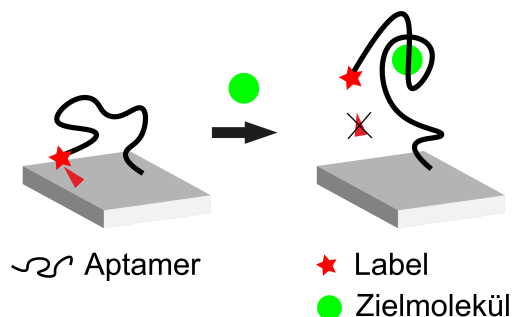
#### **Target-Induced Structural Switching (TISS)**

Der TISS-Modus nutzt die Fähigkeit des Aptamers, sich bei Bindung an das Target in eine definierte 3D-Struktur zu falten. Durch die Ausbildung des Aptamer-Target-Komplexes verändert sich die räumliche Anordnung der Nukleotide des Aptamers und so kann beispielsweise der Abstand eines Markers zur Sensoroberfläche gemessen werden. Hierfür kann beispielsweise eine quenchende Oberfläche verwendet werden, welche das Fluoreszenzsignal eines Fluoreszenzfarbstoffes unterdrückt. Sobald das Target durch das Aptamer gebunden wird, verändert



**Abb. 3.3.:** Sandwich- Aptasensordesign. Das Aptamer wird auf einer Oberfläche immobilisiert. Bei der Zugabe des Zielmoleküls wird der Aptamer-Zielmolekül-Komplex gebildet. Anschließend wird ein weiteres, markiertes Aptamer gegen das jeweilige Zielmolekül eingebracht, welches an ein anderes Epitop bindet. Die Transduktion und Quantifizierung des Zielmoleküls erfolgt anschließend über das später hinzugefügte, markierte Aptamer.

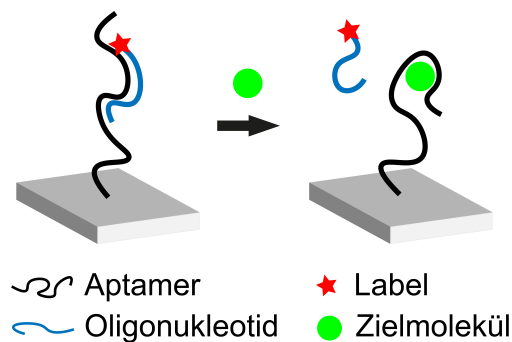
sich die Struktur des Aptamers und ein Anstieg der Fluoreszenzintensität kann gemessen werden, da der Abstand zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Oberfläche zunimmt (siehe Abb. 3.4). Aptasensoren für die Detektion von ATP unter Verwendung des TISS-Modus wurden in der Literatur ausführlich beschrieben und erfolgreich in Aptamer-Bindungspuffer getestet [42–44]. Darüber hinaus wurden umfangreiche Untersuchungen zu Kokain-Aptasensoren durchgeführt, die in der Lage waren, pikomolare Kokain-Konzentrationen in Serum nachzuweisen [45].



**Abb. 3.4.:** Ein Aptasensor im TISS-Modus. In diesem Beispiel wird ein 3'-fluoreszenzmarkiertes Aptamer über eine 5'-Modifikation kovalent einer Oberfläche immobilisiert. Durch die dreidimensionale Struktur des Aptamers befindet sich der Fluoreszenzfarbstoff in der Nähe der Oberfläche, welche das Fluoreszenzsignal quencht. Bei Zugabe des Zielmoleküls ändert sich die Aptamerstruktur bei der Bindung und das Fluoreszenzmolekül wird nicht mehr durch die Nähe zur Oberfläche gequencht. Die Transduktion erfolgt dann über eine optische Messung der Fluoreszenzintensität.

### Target-induzierte Dissoziation (TID)

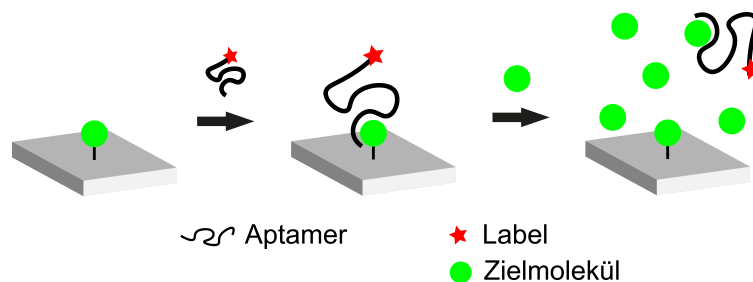
Der TID-Modus beruht, wie auch der TISS-Modus, auf den strukturellen Eigenschaften des Aptamers. Die Änderung der Aptamer-Konformation wird jedoch nicht direkt überwacht, sondern es wird die Verdrängung eines komplementären Oligonukleotids detektiert. Dieses Oligonukleotid ist in der Regel so konzipiert, dass es an der Aptamer-Target-Erkennungsstelle bindet. Dort treten häufig drastische strukturelle Veränderungen auf, wenn das Zielmolekül gebunden wird. Bei der Bindung wird das komplementäre Oligonukleotid verdrängt, was die Messung dieser Signaländerung für die Transduktion ermöglicht (siehe Abb. 3.5). In der Regel wird das Aptamer auf der Biosensoroberfläche immobilisiert und das Oligonukleotid anschließend hinzugefügt. Für Transduktionszwecke kann das komplementäre Oligonukleotid an seinem 5'- oder 3'-Terminus modifiziert werden. Eine mögliche Modifikation ist die Addition eines Cy5- oder Cy3-Moleküls, um die Änderung der Fluoreszenzintensität bei der Zielmolekülgabe zu überwachen. Der TID-Modus kann sowohl sequentiell, als auch kompetitiv durchgeführt werden. Hierbei bezieht sich die Bezeichnung auf den Zeitpunkt der Zugabe des komplementären Oligonukleotids. Wird das markierte Oligonukleotid im Vorfeld hinzugegeben, wird von einem sequentiellen TID-Modus gesprochen. Wird nun das Target hinzugegeben, wird das gebundene Oligonukleotid verdrängt. Bei dem kompetitiven TID-Modus wird das Oligonukleotid und das zu analysierende Target gleichzeitig hinzugegeben. Es kommt dann zu einer Konkurrenz um die Aptamer-Bindeplätze.



**Abb. 3.5.:** Aptasensor, welcher auf dem TID-Modus beruht. Ein komplementäres, markiertes Oligonukleotid hybridisiert mit dem immobilisierten Aptamer. Bei der Zugabe des Zielmoleküls wird der Aptamer-Zielmolekül-Komplex gebildet und das Oligonukleotid wird verdrängt. Durch anschließende Waschschrte wird das ungebundene Oligonukleotide entfernt und eine Abnahme der Signalintensität kann gemessen werden.

### Kompetitive Bindung

Bei dem kompetitiven Bindungsmodus (Competitive Replacement, CR) zirkuliert das Aptamer üblicherweise frei in dem Aptasensorsystem. Das Zielmolekül wird auf der Sensoroberfläche immobilisiert und die zu analysierende Probe mit dem selben Zielmolekül wird hinzugegeben. Da die Bindung des Aptamers an das freie, in der Probe enthaltenen, Zielmolekül bevorzugt wird, wird dementsprechend weniger immobilisiertes Target gebunden. Da das Aptamer in diesem Fall beispielsweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist und in anschließenden Waschschritten entfernt wird, kann anschließend eine Signalabnahme detektiert werden, welche mit der Analytkonzentration korreliert. Auf der Grundlage dieses Prinzips konnte ein kompetitiver Aptasensor für den Nachweis von Chloramphenicol (CHL) entwickelt werden, welcher CHL mit einer LOD von 451 pM nachweisen konnte. CHL wird dafür auf einer Oberfläche immobilisiert und ein Biotin-markiertes CHL-Aptamer hinzugefügt. Ist kein gelöstes CHL verfügbar, bindet das CHL-Aptamer an das immobilisierte CHL und die Transduktion erfolgt über Streptavidin-modifizierte Goldnanopartikel (AuNPs), die an das Biotin des Aptamers binden. Ist jedoch freies CHL vorhanden, bindet das CHL-Aptamer bevorzugt an das freie CHL [46].



**Abb. 3.6.:** Aptasensor, welcher auf dem CR-Modus beruht. Das Zielmolekül wird auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Anschließend wird das markierte Aptamer hinzugegeben, welches mit dem immobilisierten Zielmolekül eine Bindung eingeht. Wird nun die zu analysierende Testlösung (welche freies Zielmolekül enthält) hinzugegeben, kommt es zu einer Konkurrenz und das Aptamer bevorzugt das freie Zielmolekül. Durch Waschschriffe kann anschließend eine Abnahme der Signalintensität detektiert werden, da das gelabelte Aptamer ausgewaschen wird.



### 3.3.2. Aktueller Stand von Aptasensoren für die Detektion von kleinen Molekülen

Durch die Flexibilität in der Aptasensor-Entwicklung durch die verschiedenen Assay-Designs konnten in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von Aptasensoren gegen kleine Moleküle entwickelt werden. Für eine Übersicht einiger Aptasensoren für die Detektion von kleinen Molekülen siehe Tabelle 3.1.

**Tab. 3.1.:** Aptasensoren für die Detektion von kleinen Molekülen. Gezeigt sind Aptasensor-Assayformat, Nachweisgrenzen (LOD), die verwendete Probenmatrix und die jeweilige Referenz.

Zielmolekül	Assayformat	LOD	Probenmatrix	Referenz
Aflatoxin B1	TISS	pM	Bier / Wein	[47]
Aflatoxin B1	CR	nM	Puffer	[48]
Aflatoxin M1	TISS	nM	Milch	[42]
Aflatoxin M1	CR	nM	Puffer	[43]
ATP	TISS	nM	Puffer	[49]
ATP	TISS	$\mu$ M	Puffer	[44]
ATP	TISS	$\mu$ M	Puffer	[50]
Ochratoxin A	TID	nM	Puffer	[51]
Ochratoxin A	TID	nM	Traubensaft / Serum	[52]
Chloramphenicol	CR	pM	Serum / Milch	[46]
Kokain	TISS	pM	Serum	[45]
Kokain	TISS	nM	Puffer	[53]
Kokain	TISS	nM	Puffer	[54]
Estradiol	TISS	fM	Puffer	[55]
Neomycin B	CR	$\mu$ M	Puffer	[56]
Progesteron	Sandwich	nM	Puffer	[41]
25(OH)D	TID	$\mu$ M	Serum	[21]

Anhand der Tabelle lässt sich erkennen, dass der überwiegende Teil der gezeigten Aptasensoren mit dem TISS-Modus entwickelt wurden. Das TID- und CR-Design sind in gleichen Anteilen vertreten, das Sandwich-Design wurde lediglich einmal verwendet. Das Hauptargument, welches gegen die Verwendung des Sandwich-Designs bei der Detektion von kleinen Molekülen spricht, ist die Größe des Zielmoleküls. Durch die geringe Größe ist auch die Zahl der Möglichen Aptamer-Erkennungsstellen (Aptatope) begrenzt und die Bindung von mehreren Aptameren wird erschwert. Das am zweitwenigsten verwendete Aptasensor-Design ist die Verwendung des TID-Modus. Die Verwendung vom TID-Design erfordert keine genauen strukturellen Kenntnisse über das verwendete Aptamer, da häufig durch eine parallelisierte Evaluierung von verschiedenen komplementären Oligonukleotiden das optimale Oligonukleotid mit einer maximierten

Verdrängung identifiziert werden kann. Für die Verwendung des TISS-Modus sind ebenfalls keine genauen strukturellen Kenntnisse des Aptamers nötig. Die einzige Voraussetzung für die Detektion mittels TISS-Modus ist eine signifikante Strukturänderung des Aptamers bei der Targetbindung. Falls diese Strukturänderung jedoch marginal ist, kann auf den TID-Modus ausgewichen werden. Das Labeln des komplementären Oligonukleotids eröffnet dann weitere Optionen um die Signaländerung beim Verdrängen des komplementären Stranges noch weiter zu verstärken. So konnten in der Literatur Streptavidin-Biotin-Amplifikationsstrategien realisiert werden. Weiterhin bietet sich die Verwendung von Nanopartikeln, wie beispielsweise AuNPs als Amplifikationsstrategie an [46, 57].

### **3.3.3. Herausforderungen bei der Entwicklung von Aptasensoren für kleine Moleküle**

In vielen analytischen Anwendungen werden trotz der vielen Vorteile von Aptasensoren hauptsächlich Immunosensoren eingesetzt. Eine der Haupteinschränkungen für den Nachweis kleiner Moleküle, sowohl bei der Verwendung von Antikörpern, als auch Aptameren, liegt in der geringen Größe des Zielmoleküls. Das Molekulargewicht des Zielmoleküls ist in den meisten Fällen proportional zur Bindungsaffinität des Aptamers oder Antikörpers [58, 59]. Dies lässt sich durch das begrenzte Vorhandensein von funktionellen Gruppen in kleinen Molekülen erklären. Diese funktionellen Gruppen sind jedoch wichtig für die spezifische Zielerkennung und Zielbindung [60]. Folglich führen weniger funktionelle Gruppen zu einer verminderten Spezifität und Bindungsaffinität und erschweren so die Entwicklung von neuartigen, robusten Nachweissystemen für kleine Moleküle. Neben der generellen Limitation durch die geringe Molekülgröße, gibt es eine Reihe von speziellen Einschränkungen, welche besonders für Aptamere gelten. Diese potenziellen Probleme ergeben sich bei der Aptamerselektion und  $K_d$ -Bestimmung, wie im Folgenden beschrieben wird.

#### **SELEX**

Weitere Einschränkungen für die Entwicklung von Aptasensoren sind in dem SELEX-Prozess zu finden. Ein wichtiger Schritt in dem traditionellen SELEX-Verfahren ist die Immobilisierung des Zielmoleküls [61]. Durch die geringe Größe des kleinen Moleküls sind jedoch auch die freien funktionellen Gruppen für chemische Linker begrenzt. Das Einführen von neuen funktionellen Gruppen für die Immobilisierung ist theoretisch möglich, verändert jedoch auch die Struktur des kleinen Moleküls und kann zu falsch-positiven Bindungsereignissen führen

[7]. Werden die bereits vorhandenen funktionellen Gruppen für die Linker-Schritte verwendet, grenzt das die möglichen Erkennungsmotive für die Aptamere weiter ein [62]. Neuartige SELEX-Methoden wie die Durchfluss-Zytometrie-SELEX und die Fluoreszenz-aktivierte SELEX bieten eine Lösung für dieses Problem, da die Zielmoleküle nicht immobilisiert werden müssen. Diese neuartigen Verfahren wurden jedoch noch nicht mit kleinen Molekülen erprobt [37]. Weiterhin muss das Aptamer in diesen Selektionsmethoden gelabelt werden. Eine weitere, vielversprechende SELEX-Methode für die Selektion von Aptameren gegen kleine Moleküle ist die elektrochemische SELEX. Ein Aptamer gegen das kleine Molekül 11-Deoxycortisol konnte mit dieser Methode erfolgreich selektiert werden, ohne dass die Aptamere in den Selektionsschritten gelabelt werden mussten [63]. Bei der Verwendung der elektrochemischen SELEX wird das kleine Molekül auf einer Goldelektrode immobilisiert und die Aptamer-Target-Interaktion kann *in situ* voltammetrisch beobachtet werden. Das Problem der Zielmolekül-Immobilisierung besteht hier trotzdem weiterhin. Die Capture-SELEX umgeht dieses Problem, indem in diesem Verfahren die Oligonukleotide immobilisiert werden und das Zielmolekül frei vorliegt [64]. Die Capture-SELEX wurde ausgehend von der FluMag-SELEX entwickelt, mit dem Unterschied, dass das Zielmolekül nicht immobilisiert wird. Dafür wurde eine spezielle Oligonukleotidbibliothek angelegt, welche für die Selektionsschritte auf einer Oberfläche immobilisiert wird. Durch diese Vorgehensweise wird die chemische Struktur des Zielmoleküls nicht verändert und hochaffine Aptamere gegen kleine Moleküle können selektiert werden.

### **K<sub>d</sub>-Bestimmung**

Bei der Klassifizierung von neuartigen Aptameren ist die Charakterisierung der K<sub>d</sub> wichtig. Zur Bestimmung der K<sub>d</sub> des Ochratoxin A (OTA)-Aptamers wurden verschiedene Methoden verwendet. Die Ergebnisse der verschiedenen Bestimmungsmethoden zeigten jedoch eine hohe Streuung der geschätzten K<sub>d</sub> im Bereich von 125 nM bis 374 nM [65]. Die hohe Variabilität der experimentell ermittelten Dissoziationskonstanten zeigt eines der Hauptprobleme bei der K<sub>d</sub>-Bestimmung. Die Diskrepanz zwischen den verschiedenen K<sub>d</sub>-Messmethoden lässt sich auf grundlegend unterschiedliche Detektionsmethoden zurückführen. Daher sollte die K<sub>d</sub>-Methode im Hinblick auf die spätere Aptamer-Anwendung gewählt werden. Bei der Entwicklung von Aptasensoren, bei denen das Aptamer in der Regel immobilisiert wird, sollten Methoden wie SPR gewählt werden, um zuverlässige K<sub>d</sub>-Ergebnisse zu erzielen. Bei diesen Methoden wird das Aptamer für die K<sub>d</sub>-Bestimmung ebenfalls immobilisiert, wodurch die erhaltene Dissoziationskonstante auch die Wirklichkeit in der späteren Anwendung abbildet. Bei der Suche nach therapeutischen Aptameren sollten immobilisierungsfreie K<sub>d</sub>-Bestimmungsmethoden (ITC, MST,

**Tab. 3.2.:** Vergleich der Nachweisgrenzen von Aptasensoren und Immunosensoren für ausgewählte kleine Moleküle. Gezeigt sind die am sensitivsten publizierten Sensoren und deren Referenzen.

Zielmolekül	LOD <sub>Aptasensor</sub>	LOD <sub>Immunosensor</sub>	Referenz <sub>Aptasensor</sub>	Referenz <sub>Immunosensor</sub>
Tetracyclin	5 pM	13 pM	[71]	[72]
Kokain	100 pM	0,49 nM	[73]	[74]
Bisphenol A	1 pM	9 pM	[75]	[76]
Ochratoxin A	0,3 pM	5 pM	[77]	[78]
Estradiol	1 fM	55 fM	[79]	[80]

CE) verwendet werden, da das Aptamer in der späteren Anwendung ebenfalls frei im Körper zirkuliert. Weiterhin sollten zur Annäherung an die reale  $K_d$  verschiedene Methoden verwendet werden. Eine hohe Anzahl von Replikaten wird ebenfalls empfohlen. Für erste Einschätzungen der  $K_d$ , auch bei einer späteren Anwendung im immobilisierten Ansatz, bieten sich jedoch auch Methoden wie die MST oder ITC an. Diese liefern schnell Ergebnisse, ohne dass langwierige Optimierungsschritte nötig sind. Diese Optimierungen sind bei immobilisierten Aptameren nötig, da eine Immobilisierung häufig negative Auswirkungen auf die Funktionalität hat.

In den letzten Jahren wurde über einige vielversprechende neue Bestimmungsmethoden berichtet. Die ITC, die zu den kalorimetrischen und markierungsfreien Methoden gehört, wurde bei der Bestimmung des  $K_d$  von Aptameren gegen kleine Moleküle wie 25(OH)D und Kokain erfolgreich eingesetzt [21, 66]. Für die Durchführung der ITC werden jedoch hohe Aptamer- oder Targetkonzentrationen benötigt [67]. Eine weitere häufig verwendete  $K_d$ -Bestimmungsmethode ist die MST. Die MST basiert auf der thermophoretischen Mobilität von Molekülen in Temperaturgradienten. Die Mobilität des Moleküls hängt stark von seiner Größe, Hydratationshülle und Ladung ab, so dass bei der Bildung des Aptamer-Target-Komplexes eine Änderung des Bewegungsverhaltens beobachtet werden kann. Dies führt zu der Dissoziationskonstante  $K_d$ . Um die  $K_d$  in der MST zu bestimmen, sind starke strukturelle Veränderungen im Aptamer bei der Targetbindung erforderlich. Eine reproduzierbare  $K_d$ -Bestimmung mittels MST konnte bei dem 17 $\beta$ -Estradiol-bindenden Aptamer und dem etablierten ATP-Aptamer gezeigt werden. Zusätzlich wurde die MST erfolgreich für die Charakterisierung des Ochratoxin A-bindenden Aptamers eingesetzt [68–70]. Der Hauptvorteil der MST ist das geringe Probenvolumen, die schnelle Generierung von Ergebnissen und die einfache Versuchsplanung. Der größte Nachteil ist der Bedarf an markierten Interaktionspartnern. In der Regel wird das Aptamer fluoreszenzmarkiert, wobei es auch möglich ist, das Zielmolekül zu markieren. Die Markierung wird in der Regel während der chemischen Synthese des Aptamers durchgeführt. Modifikationen und Markierungen können die Bindungseigenschaften des Aptamers (und damit die  $K_d$ ) verändern und sollten daher sorgfältig evaluiert werden.

### 3.4. Aptasensoren in Point-Of-Care-Anwendungen

Patientennahe Labordiagnostik, auch POCT genannt, beschreibt in der Medizintechnik diagnostische Untersuchungen, welche unmittelbar vor Ort durchgeführt werden können. Die Durchführung der Analytik in einem Zentrallabor ist so nicht länger nötig [81]. Der derzeitige Arbeitsablauf bei der Messung von Gesundheitsparametern, wie beispielsweise 25(OH)D, ist wie folgt: Die biologische Probe wird entnommen, anschließend an ein Zentrallabor geschickt und dort analysiert. Anschließend werden die Testergebnisse an den behandelnden Arzt übermittelt. Dieser teilt dem Patienten dann im Idealfall direkt das Ergebnis mit. Häufig werden die Werte jedoch auch in einer weiteren Sprechstunde mit dem Patienten durchgegangen, was eine weitere zeitliche Verzögerung darstellt. Zu den wesentlichen Nachteilen dieses veralteten diagnostischen Ansatzes gehören hohe Personalkosten, kostspielige Geräte und lange Wartezeiten bis zum Erhalt des Testergebnisses [82]. Bei der POCT-Methode werden die biologischen Proben entnommen und direkt vor Ort analysiert. Dies geschieht häufig mit einfach zu handhabenden Geräten, bei deren Verwendung keine spezielle Ausbildung nötig ist. Ist POCT erst etabliert, können verschiedene Gesundheitsparameter schnell und kostengünstig gemessen werden. Dies würde zu einem dezentralen Ansatz der Gesundheitsüberwachung führen und schnelle und zuverlässige Ergebnisse für den Patienten an jedem beliebigen Ort liefern [83, 84]. Der Übergang vom derzeitigen Ansatz zu einem POCT-Ansatz der Diagnostik ist jedoch mühsam. So muss zum Einen ein zentraler Datenpunkt und eine Verwaltungssoftware eingerichtet, sowie ein Qualitätsmanagementsystem aufgebaut werden. Weiterhin sollte der POCT-Ansatz ein vergleichbares Qualitätsmanagement, wie in einem Zentrallabor aufweisen. Die durch POCT erhaltenen Messergebnisse sollten eine, mit dem Zentrallabor vergleichbare, hohe Reproduzierbarkeit aufweisen. Diese Herausforderungen müssen berücksichtigt werden, wenn eine Institution von der aktuellen Labordiagnostik zum POCT wechselt [85].

Bisher wurde noch kein Aptamer in einer POCT-Anwendung kommerziell verwendet. Bis sich dies ändert und Aptamere eine vollwertige Alternative zu Antikörpern in der POCT-Anwendung darstellen, ist es jedoch nur noch eine Frage der Zeit. Aptamere besitzen eine Reihe von Eigenschaften, welche sie gerade für POCT besonders attraktiv machen. So sind Langzeitstabilität, hohe Empfindlichkeit und die Regenerationsfähigkeit entscheidende Vorteile im POCT-Ansatz. Im Gegensatz zu Antikörpern sind Aptamere in POCT-Anwendungen haltbarer. So können Aptamere ohne Kühlung über einen langen Zeitraum gelagert werden, ohne dass es zu Funktioneinbußen kommt. Weiterhin bleiben Aptamere auch in harschen chemischen Bedingungen stabil, was die vorherige Probenvorbereitung minimiert. Aptamere könnten sich insbesondere bei der Erkennung kleiner Moleküle, die normalerweise wichtige Funktionen im Körper regu-

lieren und als Gesundheitsmarker relevant sind, auszeichnen. Um beispielsweise das Testen zu Hause für Patienten zu ermöglichen, ist ein weiterer wichtiger Faktor der Preis der POCT-Anwendung. Durch die Herstellung mittels chemischen Synthese sind Aptamere wesentlich günstiger als Antikörper, was ein wesentlicher Faktor bei der Etablierung von POCT-Geräten ist.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines Aptamer-basierten Systems zur Detektion von 25(OH)D. Aptamere sind in der Lage verschiedenste Moleküle mit einer hohen Affinität zu binden. Besonders für die Detektion von kleinen Molekülen, sogenannten Small Molecules, eignen sich Aptamere besonders, da eine Reihe von Assay-Designs möglich sind. Dadurch lassen sich auch geringe Änderungen, wie beispielsweise in der Molekülmasse des Aptamers, detektieren und amplifizieren. Antikörper sind häufig nicht in der Lage diese niedermolekularen Verbindungen zu binden. Kleine Moleküle werden häufig als Gesundheitsmarker detektiert, da sie wichtige regulatorische Funktionen im Körper übernehmen.

Um einen aptamerbasiertes Detektionsprinzip für die Bestimmung von 25(OH)D zu entwickeln, wurde ein 25(OH)D-bindendes Aptamer (Vitamin D-Binding Aptamer 14, VDBA14) zunächst charakterisiert (Kapitel 4.1). Anschließend wurde ein kompetitives Assayformat für die hochsensitive 25(OH)D-Detektion im Microarray-Format etabliert (Kapitel 4.4). Abschließend wurde die Detektionsmethode hinsichtlich Sensitivität, Bestimmungs- und Nachweisgrenze mit kommerziell erhältlichen Assays verglichen (Kapitel 4.5).

### 4.1. Charakterisierung von VDBA14

Der erste Schritt der Assayentwicklung umfasste die Charakterisierung des 25(OH)D-bindenden Aptamers. Dabei wurde das Aptamer auf das Vorhandensein von komplexen Tertiärstrukturen mittels Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) und in der MST analysiert. Weiterhin wurde überprüft, wie sich die Bindung des Targets 25(OH)D auf diese Strukturen auswirkt und ob in verschiedenen Messverfahren die Ausbildung eines Aptamer-25(OH)D-Komplexes beobachtet werden kann. Anhand des Bindungsverhaltens von VDBA14 bei verschiedenen 25(OH)D-Konzentrationen wurde anschließend die  $K_d$  bestimmt. Die  $K_d$  ist eine wichtige Kennzahl bei der Charakterisierung von neuartigen Aptameren und gibt Auskunft über die Affinität des Aptamers zu dem Zielmolekül.

#### 4.1.1. Strukturelle Eigenschaften von VDBA14

In dieser Arbeit wurde das 25(OH)D-bindende Aptamer VDBA14, welches von Lee *et al.* im Jahr 2018 selektiert wurde, verwendet [21]. Das Aptamer mit einer Länge von 56 Nukleotiden ist nachfolgend gezeigt.

5' AGCAGCACAGAGGTCATGGGGGGTGTGACTTTGGTGTGCCTATGCGTGCTACGGAA

**Tab. 4.1.:** Analyse der VDBA14-Sequenz auf das Vorhandensein von Quadruplexbildenden, G-reichen Sequenzabschnitten (QGRS). Aufeinanderfolgende Guanine sind markiert, da sie die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von G-Quadruplexen stark erhöhen.

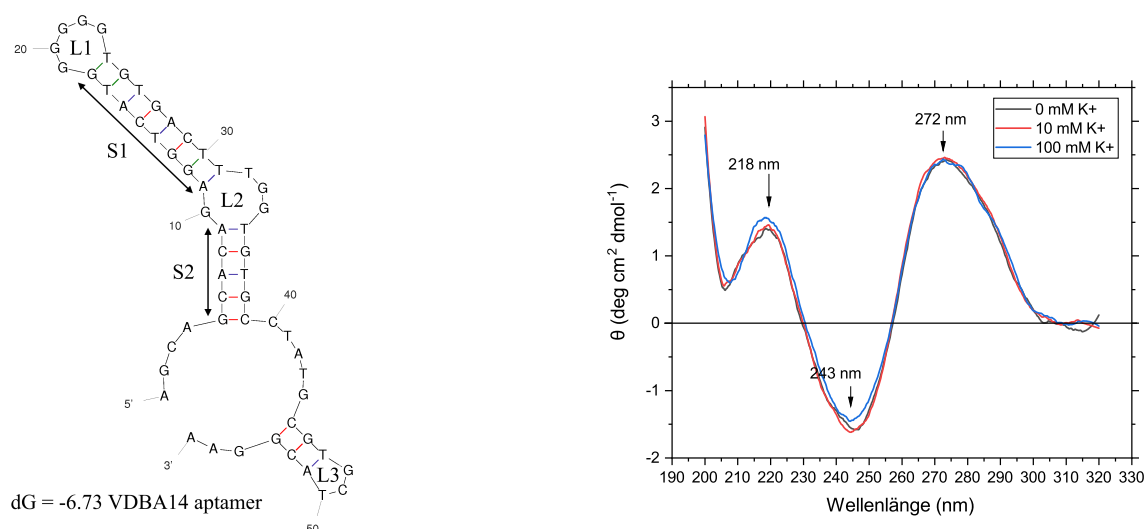
QGRS	G-Score
<b>GGTCATGGGGGGTGTGACTTTGG</b>	10
<b>GGTCATGGGGGGTGTGACTTTGG</b>	12
<b>GGTCATGGGGGGTGTGACTTTGG</b>	14
<b>GGTCATGGGGGGTGTGACTTTGG</b>	11
<b>GGTCATGGGGGGTGTGACTTTGG</b>	13
<b>GGTCATGGGGGGTGTGACTTTGG</b>	12

Als erster Schritt der Aptamercharakterisierung wurden mittels bioinformatischer Analysen die strukturellen Eigenschaften von VDBA14 untersucht. Das verwendete Aptamer weist eine GC-reiche Sequenz auf (57 %). Weiterhin befinden sich in dem Aptamer mehrere aufeinanderfolgende Guanin-Nukleotide. Diese G-reiche Nukleotidabfolge begünstigt die Ausbildung von intra- oder intermolekularen G-Quadruplexen. G-Quadruplexe sind komplexe Tertiärstrukturen, die sich unter bestimmten Bedingungen in Aptameren ausbilden können. Dabei können sie sowohl für die Targetbindung von Vorteil sein, als auch einen negativen Einfluss auf die spätere Assayentwicklung haben. Um die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von G-Quadruplexen zu untersuchen, wurde VDBA14 mit einem QGRS-Mapper (Quadruplex forming G-Rich Sequences) analysiert. Dieses Verfahren analysiert die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Nukleotidsequenz G-Quadruplexe bildet. Dabei ist der höchstmögliche Score bei einer QGRS-Länge von 30 nt 105. Bei der Analyse konnten sechs Sequenzabfolgen gefunden werden, welche in der Lage sein könnten G-Quadruplexe auszubilden. Dabei lag der höchste G-Score bei 14 (siehe Tab. 4.1), was einer eher geringen Wahrscheinlichkeit für die Ausprägung von G-Quadruplexen in dieser Anordnung entspricht.

VDBA14 könnte somit laut der bioinformatischen Analyse zu der Ausbildung von G-Quadruplex-Tertiärstrukturen in der Lage sein, die Wahrscheinlichkeit hierfür ist jedoch als gering zu betrachten. Bei der Assayentwicklung können diese Tertiärstrukturen zu einer Reihe von Problemen führen. Bei Detektionsmethoden, bei denen die Transduktion durch strukturelle Änderungen erfolgt, können G-Quadruplexe die strukturelle Flexibilität des Aptamers einschränken [42, 44]. Wenn die G-Quadruplex-Struktur an der Targetbindung beteiligt ist, sich aber auch



in Abwesenheit des Targets bildet, kommt es bei Targetbindung zu keiner strukturellen Umlagerung, was auch in keiner Signaländerung resultiert. Diese Änderung ist jedoch für die Transduktion nötig. Die Detektion mit dem TID- und TISS-Modus beruhen auf diesen strukturellen Veränderungen. Das Vorhandensein der stabilen G-Quadruplex-Strukturen führt bei der Verwendung des TID-Modus zu einer unvollständigen Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide. Für die Oligonukleotid-Hybridisierung muss das Aptamer teils ungefaltet vorliegen und strukturell flexibel sein. Sind G-Quadruplexe vorhanden, sind die Aptamerstrukturen relativ starr und die Hybridisierung wird eingeschränkt. Um die Struktur von VDBA14 auf G-Quadruplexe zu analysieren, wurden daher CD-spektroskopische Untersuchungen des Aptamers durchgeführt. Auch der Einfluss von Kaliumionen im Aptamerbindepuffer auf die Aptamerstruktur wurde analysiert. Die Sekundärstruktur von VDBA14 wurde mittels mFold vorhergesagt (Abb. 4.1). Die gezeigten CD-Spektren (Abb. 4.1b) wurden aus drei Scans gemittelt und anschließend die Elliptizität gegen die jeweilige Wellenlänge aufgetragen.



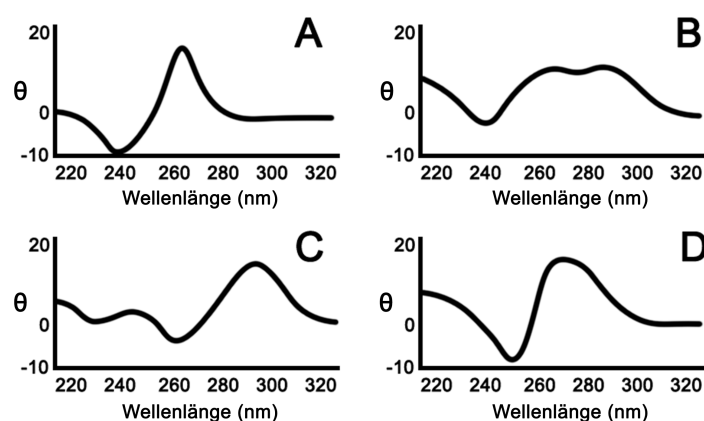
(a) Vorhersage der Sekundärstruktur von VDBA14 durch mFold.

(b) CD-Spektrum von VDBA14 bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen

**Abb. 4.1.:** Charakterisierung der Aptamerstruktur mittels mFold und CD-Spektroskopie. **(a)** Vorhergesagte Sekundärstruktur des 25(OH)D-Aptamers (VDBA14) mittels mFold-Analyse. Stem-Strukturen sind mit S gekennzeichnet, wohingegen Loop-Strukturen mit L gekennzeichnet sind. Die freie Enthalpie der Sekundärstruktur beträgt  $dG = -6,73$ . **(b)** Cirkulardichroismus-Spektrum von VDBA14 in Gegenwart von drei verschiedenen Bindungspuffern mit steigender Kaliumkonzentration (0 mM bis 100 mM  $K^+$ ). Die Spektren wurden durch die Akkumulation von drei Scans erhalten, welche von 200 nm bis 320 nm aufgenommen wurden.

Das CD-Spektrum von VDBA14 zeigt eine schwach positive Bande bei 218 nm, sowie eine stark negative Bande bei 243 nm. Eine weitere stark positive Bande kann bei 272 nm beobachtet werden. Anhand der Orientierung (positive oder negative Ellipzität) der Banden und Wellenlängen der Banden lässt sich anschließend das CD-Spektrum mit Literaturwerten vergleichen. Die in Abb. 4.1b gezeigten CD-Spektren von VDBA14 wurden mit verschiedenen G-Quadruplex-Spektren aus der Literatur verglichen. Generell lassen sich G-Quadruplexe in zwei Gruppen einteilen: Parallele und Antiparallele G-Quadruplexe. Bei parallelen G-Quadruplexen verlaufen die Nukleinsäurenstränge in die selbe Richtung, bei antiparallelen G-Quadruplexen laufen die Stränge entgegengesetzt aneinander vorbei. Weiterhin lassen sich die antiparallelen G-Quadruplexe in Gruppe II und III unterteilen, wobei die Klassifizierung durch die Kombination der GBA (Glycosidic Binding Angles) erfolgt. In CD-Spektren können parallele Quadruplexe können durch eine starke positive Bande bei 260 nm identifiziert werden (Abb. 4.2 A). Antiparallele G-Quadruplexe (Abb. 4.2 B und C) weisen eine positive Bande bei 290 nm auf. Antiparallele Quadruplexe der Stufe II (Abb. 4.2 B) weisen weiterhin eine negative Bande bei 240 nm auf, wohingegen Stufe III (Abb. 4.2 C) eine negative Bande bei 260 besitzt [86, 87]. B-DNA ist eine der möglichen Doppelhelixstrukturen, welche DNA-Moleküle einnehmen können. Dabei ist B-DNA eine doppelsträngige DNA-Helix, welche strukturell die klassische DNA-Anordnung ist. Neben der B-Form existieren noch die A-Form und Z-Form, welche kompaktere Anordnungen der Nukleotide darstellen. Dadurch sind diese Strukturen gespannter und komprimierter. Auch die verschiedenen DNA-Formen lassen sich mittels CD-Spektroskopie bestimmen. Bei der CD-spektroskopischen Analyse von VDBA14 konnte gezeigt werden, dass das Aptamer eine B-Form einnimmt (Abb. 4.2 D). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass VDBA14 keine G-Quadruplex-Struktur unter Abwesenheit von 25(OH)D ausbildet.

Die Bildung von G-Quadruplexen ist stark von Pufferbedingungen abhängig, wie beispielsweise der Konzentration von monovalenten und divalenten Kationen. Besonders Kaliumionen fördern die Ausbildung von G-Quadruplexen [44]. Daher müssen bei der strukturellen Analyse von Aptameren auf G-Quadruplexe auch verschiedene Pufferbedingungen betrachtet werden. In weiteren CD-Spektroskopischen Untersuchungen konnte auch bei hohen  $K^+$ -Konzentrationen von bis zu 100 mM keine Veränderung der Aptamerstruktur beobachtet werden (Abb. 4.1b). Der Aptamerbindepuffer, welcher während der Aptamerselektion verwendet wurde, beinhaltet standardmäßig 5 mM KCl. Somit bildet VDBA14 auch bei stark G-Quadruplex fördernden Bedingungen des Puffers keine dieser Tertiärstrukturen aus. Einen weiteren Einfluss auf die Aptamerstruktur hat das Zielmolekül, welches durch das Aptamer gebunden wird. Es ist möglich, dass durch die Bindung des Zielmoleküls G-Quadruplex-Strukturen gebildet werden, welche durch die oben genannten Ionen noch weiter stabilisiert werden. Die VDBA14-

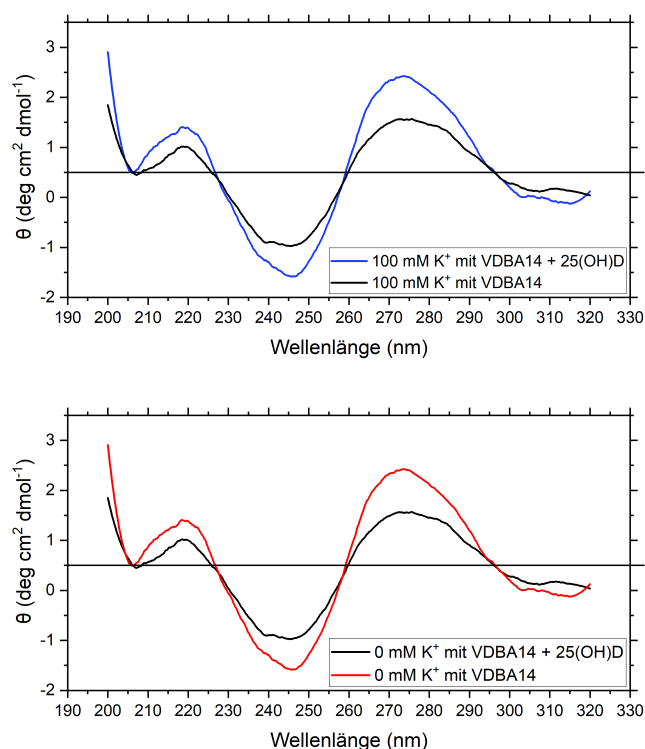


**Abb. 4.2.:** Typische Circular dichroismus-Spektren von G-Quadruplexen und B-Form DNA. **a** CD-Spektrum von parallelen G-Quadruplexen. **b** CD-Spektrum von antiparallelen G-Quadruplexen der Gruppe II. **c** CD-Spektrum von antiparallelen G-Quadruplexen der Gruppe III. **d** CD-Spektrum von B-Form DNA. Die Kurvenverläufe der CD-spektroskopischen Aufnahmen von G-Quadruplexen wurden basierend auf [87] erstellt.

25(OH)D-Interaktion wurde in zwei verschiedenen Ansätzen (0 mM KCl und 100 mM KCl) erneut mittels CD-Spektroskopie untersucht. Die daraus resultierenden Spektren sind in Abb. 4.3 zu sehen.

Wie bereits bei den CD-Spektren von VDBA14 bei Abwesenheit des Targets 25(OH)D, zeigen die Spektren eine positive Bande bei 218 nm. Eine weitere, negative Bande befindet sich bei 243 nm, gefolgt von einer stark positiven Bande bei 272 nm. Bei der Zugabe von 25(OH)D (schwarze Kurven) zeigt sich keine Verschiebung der Banden in y-Richtung, was für eine signifikante strukturelle Veränderung des Aptamers sprechen würde. Hohe Kaliumkonzentrationen von 100 mM führten ebenfalls zu keiner Entstehung von komplexen Tertiärstrukturen und die VDBA14-Struktur besaß weiterhin alle Charakteristika von B-Form DNA. Bei beiden Kaliumkonzentrationen sind Änderungen der Ellipzitätsintensität zu beobachten, wenn das Zielmolekül 25(OH)D hinzugegeben wurde. Dies spricht für eine Einlagerung von 25(OH)D in die B-Form-Struktur von VDBA14, was in nur geringen strukturellen Änderungen des Aptamers resultiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass VDBA14 trotz der GC-reichen Sequenz auch bei G-Quadruplex-fördernden Bedingungen (hohe Kaliumkonzentration) keine der komplexen Tertiärstrukturen ausbildet. Auch bei der Target-Bindung kommt es zu keiner strukturellen Umlagerung des Aptamers und es behält die B-Form. Es lässt sich vermuten, dass sich das Zielmolekül 25(OH)D in die B-förmige DNA einlagert und daraus nur eine geringe strukturelle Änderung



**Abb. 4.3.:** Cirkulardichroismus-Spektren des VDBA14-25(OH)D-Komplexes (blau und rot) und von VDBA14 ohne das Vorhandensein von 25(OH)D (schwarz). 10  $\mu$ M 25(OH)D und 10  $\mu$ M Aptamer (finale Konzentrationen) wurden dafür in Aptamerbindepuffer mit 10 % Ethanol gelöst und anschließend (entweder ohne KCl oder mit 100 mM KCl) vermessen. Die Spektren wurden durch die Akkumulation von drei Scans erhalten, welche von 200 nm bis 320 nm aufgenommen wurden.

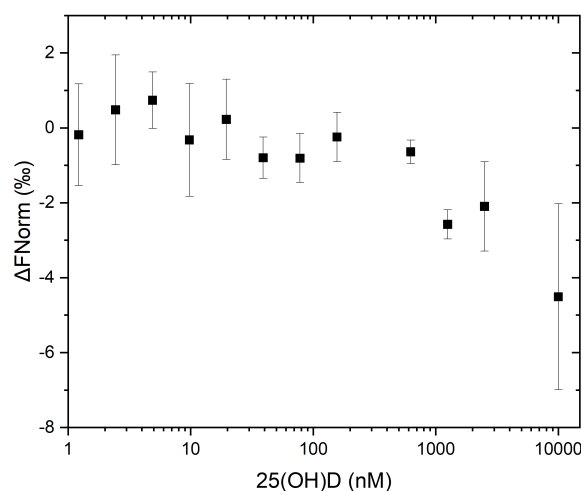
im Aptamer resultiert. Um die VDBA14-25(OH)D-Bindung genauer zu charakterisieren, wurde in den folgenden Schritten die  $K_d$  bestimmt. Hierfür wurde die MST verwendet.

### 4.1.2. Untersuchung der Affinität von VDBA14

Nachdem die Struktur von VDBA14 in Kapitel 4.1.1 auf das Vorhandensein von G-Quadruplexen untersucht wurde, folgte als nächster Charakterisierungsschritt die Detektion der Aptamer-Target-Bindung. Für die Analyse von Interaktionen zwischen Biomolekülen eignet sich die MST, da schnell Bindungsereignisse detektiert werden können. Werden Bindungsereignisse mittels MST detektiert, kann anschließend die Dissoziationskonstante, auch  $K_d$  genannt, bestimmt werden. Die  $K_d$  ist die Konzentration, bei der die Hälfte der Aptamere das Target gebunden hat. Je größer die  $K_d$ , desto weiter liegt dieses Gleichgewicht auf der ungebundenen, dissoziierten Seite der Interaktion. Dadurch ist diese Kennzahl auch für die Aptamercharakterisierung wichtig. Mit der  $K_d$  lässt sich die Affinität des Aptamers zu seinem Target beschreiben. Je kleiner die  $K_d$ , desto höher ist diese Affinität und desto spezifischer ist das verwendete Aptamer. Für die Durchführung einer MST wird ein ungelabelter Bindungspartner gegen einen fluoreszenzmarkierten Bindungspartner titriert. Anschließend wird die thermophoretische Bewegung bei verschiedenen Konzentrationen betrachtet. Durch die Interaktion (in diesem Fall der Aptamer-Target-Bindung) verändert sich die thermophoretische Bewegung bei den verschiedenen Konzentrationen. Diese Veränderung wird in der MST detektiert und die Generierung einer Bindungskurve ist möglich.

Um die Interaktion von VDBA14 und dem Target 25(OH)D zu analysieren, wurde VDBA14 am 5'-Terminus mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Das gelabelte Aptamer wurde mit einer Endkonzentration von 10 nM eingesetzt. Die 25(OH)D-Konzentration wurde von 10  $\mu$ M bis 1 nM variiert. Die Interaktion der beiden Bindungspartner wurde dann bei Raumtemperatur in der MST analysiert (Abb. 4.4).

In den Messwerten der MST lässt sich eine abnehmende Fluoreszenzintensität mit steigenden 25(OH)D-Konzentrationen erkennen. Die maximale Amplitudendifferenz beträgt  $\Delta F_{\text{Norm}} = 4\%$ . Für eine aussagekräftige MST sollte diese Amplitude mindestens 6% betragen, weshalb eine höhere Amplitude für die Detektion von Bindungsereignissen bevorzugt wird. Durch die vorangegangenen CD-spektrometrischen Untersuchungen in Kapitel 4.1.1 konnte gezeigt werden, dass die Tertiärstruktur von VDBA14 die B-Form einnimmt. Diese Strukturen zeichnen sich durch doppelsträngige Bereiche aus, welche durch hohe Temperaturen aufgebrochen werden können. Demnach könnte die Erhöhung der Temperatur während des MST-Laufs die Aptamerstruktur leicht instabilisieren und so bei Zugabe von höheren Targetkonzentrationen zu signifikanten strukturellen Änderungen führen. Diese Änderungen könnten dann leichter in der MST detektiert werden. Der Anteil von GC-Basenpaaren ist maßgeblich für die Schmelztemperatur von Desoxyribonukleinsäuren. Die berechnete Schmelztemperatur von VDBA14

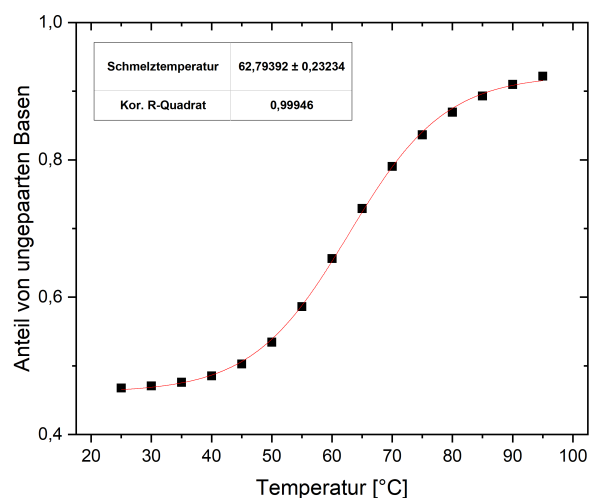


**Abb. 4.4.:** Interaktion von VDBA14 und 25(OH)D bei Raumtemperatur. Für die MST-Messung wurde 25(OH)D zuvor seriell in Aptamerbindepuffer mit 10 % (v/v) Ethanol verdünnt. Anschließend wurde jede Verdünnungsstufe mit 10 nM 5'-Cy5-markierten VDBA14 vermischt (finale Konzentration). Nach einer Inkubation von 1 h wurde die Interaktion der beiden Biomoleküle bei Raumtemperatur mittels MST vermessen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von drei individuellen MST-Experimenten dar (N = 3). Die Bindungskurve wurde mit der NT.Analysis Software generiert und in Origin 2018 bearbeitet.

liegt bei 76,3 °C, eine Simulation der Schmelztemperatur von VDBA14 mittels NUPACK zeigte einen  $T_m$ -Wert von 63 °C. Die durchgeführte Simulation ist in Abb. 4.5 gezeigt.

Bereits bei Raumtemperatur sind 45 % der Basen in dem 25(OH)D-Aptamer ungepaart. Dies konnte in einer mFold-Strukturvorhersage (Abb. 4.1a) bestätigt werden, da ein Großteil der Basen ungepaart in Loop-Strukturen vorliegt. Die Simulation der Schmelztemperatur zeigte weiterhin, dass sich bei der Erhöhung der Temperatur der Anteil ungepaarter Basen erhöht. Eine Sättigung ist ab 95 °C erreicht. Bei dieser Temperatur liegen nur noch 10 % der Nukleotide gepaart vor. Die ermittelte Schmelztemperatur der Analyse lag bei 63 °C. Um den Einfluss der Temperatur auf die Targetbindung durch VDBA14 zu untersuchen, wurde eine weitere NUPACK-Strukturanalyse durchgeführt. Dabei wurde das Equilibrium von gepaarten zu ungepaarten Basen bei drei verschiedenen Temperaturen simuliert (Abb. 4.6).

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse ist zu erwarten, dass sich die Struktur des Aptamers bei steigender Temperatur verändert und sich so bestimmte Sekundärstrukturen umlagern können. Die NUPACK-Strukturanalyse zeigt bereits bei einer Temperaturerhöhung von 25 °C auf 35 °C eine Strukturveränderung im unteren Bereich des Aptamers (Pfeil i, Abb. 4.6 (A)). Eine weitere Erhöhung auf 45 °C führt zu keinen signifikanten Strukturänderungen von VDBA14.

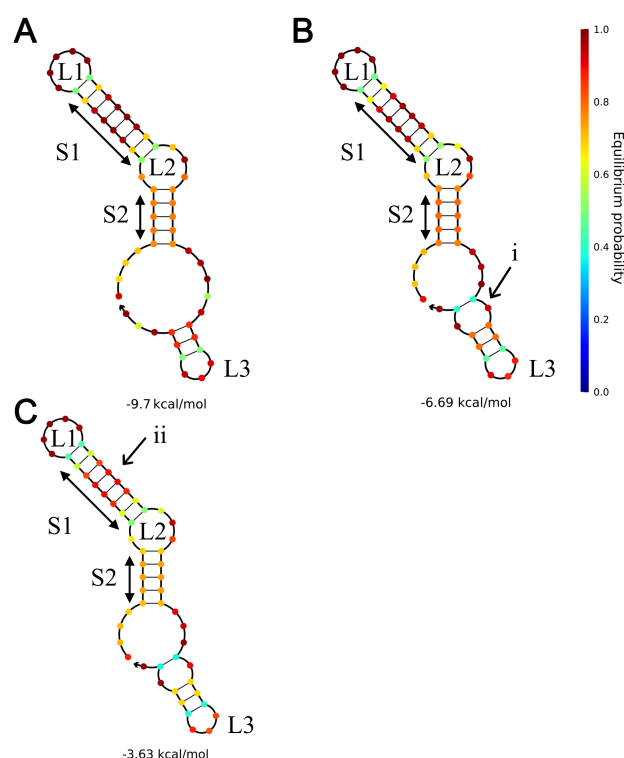


**Abb. 4.5.:** Simulierte Schmelzkurve von VDBA14. Die Simulation der Schmelzkurve wurde mit der NUPACK-Software durchgeführt und zeigt den Anteil von ungepaarten Basen im Aptamer bei verschiedenen Temperaturen. Die Analyse wurde wie in [88] angegeben durchgeführt.

Der obere Bereich von VDBA14 (Loop L1 und Stem S1) bleiben weitestgehend unverändert. Dies wurde erwartet, da es sich bei Loops um stabile Sekundärstrukturen handelt. Der G-reiche Loop L1 besitzt eine hohe strukturelle Stabilität, auch bei steigender Temperatur. Eine leichte Instabilisierung der Stem-Struktur S1 ist bei steigender Temperatur zu beobachten (Pfeil ii, Abb.4.6 (C)). Im unteren Bereich von VDBA14 sind die oben genannten strukturellen Umlagerungen zu beobachten. Das Equilibrium bewegt sich dort in Richtung zu ungepaarten Nukleotiden (Gelb-Blau).

Da in der vorangegangenen MST (Abb. 4.4) keine eindeutige Bindung von VDBA14 an 25(OH)D nachgewiesen werden konnte, wurde erneut eine MST durchgeführt. Die Temperatur während des Laufes wurde auf 35 °C erhöht, da sich in den strukturellen Analysen gezeigt hat, dass dies die Sekundärstruktur von VDBA14 leicht instabilisiert. Durch die anschließende Hinzugabe von 25(OH)D wurde eine Stabilisierung der Aptamerstruktur erwartet. Diese Strukturänderung würde dann, anders als bei Raumtemperatur, in der MST zu einem eindeutigen Bindungsereignis führen. Das Ergebnis dieses MST-Experimentes ist in Abb. 4.7 gezeigt.

Der Verlauf der MST-Kurve bei 35 °C weicht stark von der vorangegangenen MST-Kurve bei Raumtemperatur (Abb. 4.4) ab. Auffällig ist, dass die Standardabweichung bei der höheren Temperatur zwischen den drei MST-Läufen geringer ist, als bei der MST bei Raumtemperatur. Weiterhin ist die Amplitude der Bindungskurve bei 35 °C höher ( $\Delta F_{\text{Norm}} = 6\%$ ). Ab einer 25(OH)D-Konzentration von ca. 100 nM stellt sich eine Sättigung des Aptamer-25(OH)D-

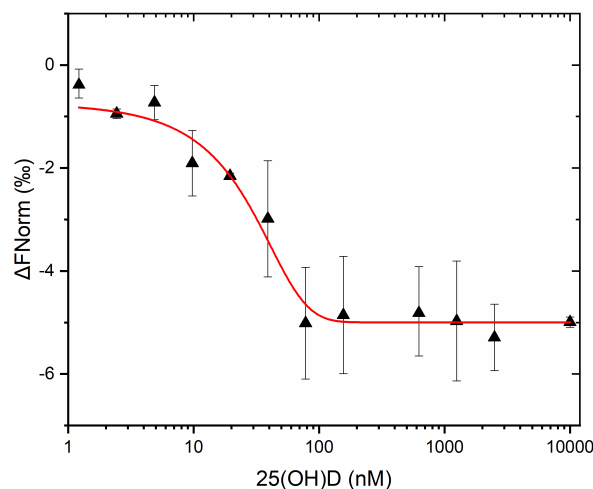


**Abb. 4.6.:** Vorhersage der Sekundärstruktur von VDBA14 bei verschiedenen Temperaturen mittels NUPACK. Gezeigt ist die Wahrscheinlichkeit, dass das farblich gekennzeichnete Nukleotid die dargestellte Position im Gleichgewicht einnimmt. Rot entspricht einer hohen Stabilität, blau einer niedrigen Stabilität. **(A)** Simulation der VDBA14-Sekundärstruktur bei 25 °C **(B)** Simulation der VDBA14-Sekundärstruktur bei 35 °C **(C)** Simulation der VDBA14-Sekundärstruktur bei 45 °C. Die Analyse wurde mit dem in [88] beschriebenen Algorithmus durchgeführt.

Komplexes ein. Weiterhin ist zu erkennen, dass die durch das Fitting erstellte Bindungskurve ab ca. 10 nM abflacht, was ebenfalls auf eine Sättigung deutet.

Verglichen mit dem MST-Lauf bei 25 °C konnte eine Erhöhung der Temperatur während des Laufes den gewünschten Effekt erzielen und es konnte ein eindeutiges Bindungsereignis beobachtet werden. Nicht nur die Standardabweichung zwischen drei individuellen MST-Läufen konnte so stark verringert werden, auch das Abschätzen einer  $K_d$  ( $K_d = 14,99$  nM) war nun möglich. Die Amplitude, welche eine Angabe über die Stärke der strukturellen Veränderung ist, ist in dem höher temperierten MST-Lauf ebenfalls wesentlich größer, was für stärkere strukturelle Änderungen in VDBA14 spricht. Für die weitere Assay-Entwicklung ist die Abschätzung der  $K_d$  insofern wichtig, da sie eine Kennzahl für die Affinität des Aptamers zu dem Target ist. Eine  $K_d$  im nanomolaren Bereich ermöglicht die hochsensitive Detektion von 25(OH)D im





**Abb. 4.7.:** Interaktion von VDBA14 und 25(OH)D bei 35 °C. Für die MST-Messung wurde 25(OH)D zuvor seriell in Aptamerbindepuffer mit 10 % (v/v) Ethanol verdünnt. Anschließend wurde jede Verdünnungsstufe mit 10 nM 5'-Cy5-markierten VDBA14 (finale Konzentration) vermischt. Nach einer Inkubation von 1 h wurde die Interaktion der beiden Biomoleküle bei 35 °C mittels MST vermessen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von drei individuellen MST-Experimenten dar (N = 3). Die Bindungskurve wurde mit der NT.Analysis Software generiert und in Origin 2018 bearbeitet.

späteren Entwicklungsverlauf, da das Target auch im nanomolaren Konzentrationsbereich vorliegt.

Zusammenfassend lassen sich mithilfe der CD-Spektren und MST-Messungen vermuten, dass das Aptamer das Target in seiner B-Form-Struktur bindet und dabei keine starken strukturellen Veränderungen oder Umlagerungen auftreten. Wäre es zu drastischen Umlagerungen der Sekundär- und Tertiärstruktur gekommen, hätte dies in den CD-Spektren und in der MST bei Raumtemperatur ersichtlich sein müssen. Lediglich die Erhöhung der Temperatur während der MST führte zur erfolgreichen Messung eines Bindungsereignisses. Durch die erhöhte Temperatur wird die Aptamerstruktur leicht instabilisiert, wodurch sich bei 25(OH)D-Bindung stärkere strukturelle Änderungen ergeben. Bei einer Temperaturerhöhung bleiben die Loops L1 und L2 unverändert, lediglich an Loop 3 kommt es zu einer Umlagerung. Weiterhin führt die Erhöhung der Temperatur zur Instabilisierung der Stems S1 und S2, was weitere mögliche Aptatope darstellen.

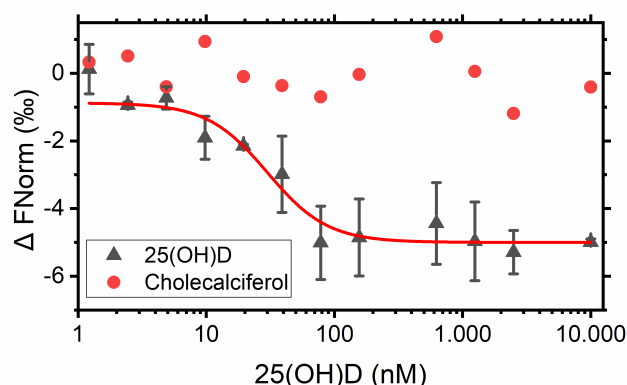
Nachdem in den Abschnitten 4.1.1 und 4.1.2 die VDBA14-Struktur und Affinität zum Zielmolekül 25(OH)D aufgeklärt werden konnte, wird im nächsten Schritt die Spezifität von VDBA14 überprüft. Da der zu entwickelnde entwickelte Sensor in seiner finalen Anwendung

25(OH)D ohne potentielle Kreuzreaktionen nachweisen soll, ist dieser Schritt äußerst wichtig. Das Vorhandensein einer Reihe von 25(OH)D-Vorgängermolekülen wie Prä-Vitamin D<sub>3</sub> und 7-Dehydrocholesterol erschweren die Detektion von 25(OH)D in der finalen Anwendung im POCT-Ansatz.

#### 4.1.3. Untersuchung der Spezifität von VDBA14

Ein weiterer wichtiger Charakterisierungsschritt von Aptameren ist die Bestimmung der Spezifität. Bei der Selektion von Aptameren gegen größere Targets, wie beispielsweise Proteinen, gibt es für das Aptamer viele mögliche Erkennungsstellen. Je weniger funktionelle Gruppen ein Molekül besitzt, desto unspezifischer können die Aptamer-Target-Interaktionen werden, da die erkannten Gruppen in ähnlicher Konfiguration auch in anderen Molekülen vorkommen können. Im Falle der kleinen Moleküle ist dies besonders kritisch, da diese Moleküle gegebenenfalls nur Hydroxyl- oder Methylgruppen als Erkennungsmerkmale besitzen. Am Beispiel der Detektion des kleinen Moleküls Ethanolamin konnte gezeigt werden, dass Ethyl- und Methylamin-Gruppen essentiell für die Aptamererkennung sind [89]. Besitzen andere Moleküle, wie beispielsweise das strukturell ähnliche Propylamin auch diese Gruppen, wird die Aptamerbindung unspezifisch. Unspezifische Targetbindungen können besonders bei der Bestimmung von Metaboliten im menschlichen Körper vorkommen, da eine Reihe von (Zwischen-)Biosyntheseprodukten im Blut zirkulieren. Dies führt zu falschpositiven Ergebnissen oder einer Überschätzung der tatsächlich vorhandenen Konzentration des Analyten, falls das Aptamer nicht spezifisch ist.

Um die Kreuzreaktivität des Aptamers mit anderen, strukturell verwandten Molekülen auszuschließen, wurde erneut eine MST durchgeführt. In der MST wurden die Interaktion von VDBA14 mit dem Target 25(OH)D, sowie die Interaktion von VDBA14 mit dem Vorläufermolekül Vitamin D<sub>3</sub> untersucht. Dieses Molekül ist die Vorstufe von 25(OH)D und unterscheidet sich lediglich durch eine nicht vorhandene Hydroxylgruppe von 25(OH)D. Die MST-Messungen wurden bei 35 °C durchgeführt. Die beiden Moleküle werden in zwei getrennten MST-Läufen im Bereich von 1 nM bis 10 µM verdünnt und mit einer konstanten 5'-Cy5-VDBA14-Konzentration von 10 nM vermischt. Abb. 4.8 zeigt das Ergebnis der MST-Analysen.



**Abb. 4.8.:** Interaktion von VDBA14, 25(OH)D und Cholecalciferol (Vitamin D) bei 35 °C. Für die MST-Messung wurde 25(OH)D bzw. Vitamin D zuvor seriell in Aptamerbindepuffer mit 10 % (v/v) Ethanol verdünnt. Anschließend wurde jede Verdünnungsstufe mit 10 nM 5'-Cy5-markierten VDBA14 (finale Konzentration) vermischt. Nach einer Inkubation von 1 h wurde die Interaktion der Biomoleküle bei 35 °C mittels MST vermessen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von drei individuellen MST-Experimenten dar (N = 3). Die Bindungskurve wurde mit der NT.Analysis Software generiert und in Origin 2018 bearbeitet.

Bei der Verwendung von 25(OH)D konnte, wie im vorherigen Abschnitt 4.1.2, eine Bindungskurve beobachtet werden. Diese Bindungskurve zeichnet sich durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf aus, was ein Hinweis auf ein vorgelageres Gleichgewicht sein könnte. So können beispielsweise verschiedene Aptamerfaltungen im Gleichgewicht stehen, jedoch nur eine dieser Stufen ist in der Lage das Target zu binden.

Bei der Verwendung des Vorläufermoleküls Vitamin D<sub>3</sub>, auch Cholecalciferol genannt, konnte keine Bindungskurve beobachtet werden. Die erhaltenen Messwerte zeigten keine Tendenz, wodurch eine Interaktion zwischen VDBA14 und diesem Molekül ausgeschlossen werden kann. VDBA14 ist somit in der Lage, die zwei Moleküle nur durch das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe zu unterscheiden und spezifisch nur 25(OH)D zu binden.

25(OH)D liegt, verglichen mit den anderen Vitamin D-Zwischenprodukten, im menschlichen Körper mit der höchsten Konzentration vor. Das in der MST analysierte Biosynthesezwischenprodukt Vitamin D<sub>3</sub> liegt im Körper mit der zweitgrößten Konzentration vor. Andere Biosynthesestufen des Vitamin D-Stoffwechsels, wie beispielsweise 7-Dehydrocholesterol und Prä-Vitamin-D<sub>3</sub> können für die Betrachtung der Spezifität vernachlässigt werden. Diese Moleküle sind nur in der Epidermis vorhanden, lediglich Vitamin D<sub>3</sub>, 25(OH)D und das Produkt der Biosynthese Calcitriol kommen im menschlichen Blutkreislauf vor.

In den vorangegangenen Kapiteln 4.1.1, 4.1.2 und 4.1.3 wurde das 25(OH)-bindende Aptamer VDPA14 charakterisiert. Die Bindungsaffinität, Aptamerstruktur und Spezifität des Aptamers wurde bestimmt. Dies ermöglicht im nächsten Schritt die Entwicklung eines Assays für die Detektion von 25(OH)D.

## 4.2. Entwicklung von komplementären Oligonukleotiden für den TID-Assay

Sowohl die aufgenommenen CD-Spektren (Kapitel 4.1.1), als auch die MST-Messungen (Kapitel 4.1.2) zeigten, dass bei der 25(OH)D-Bindung bei Raumtemperatur keine signifikanten strukturellen Veränderungen im Aptamer auftreten. Lediglich bei der Erhöhung der Temperatur konnte eine strukturelle Veränderung bei 25(OH)D-Bindung beobachtet werden. Für die Entwicklung eines 25(OH)D-Assays führt dies zum Ausschluss des TISS-Modus. Das Detektionsprinzip des TISS-Modus beruht auf einer signifikanten strukturellen Änderung des Aptamers bei der Bindung des Zielmoleküls. Diese strukturelle Änderung sollte bereits bei geringen Targetkonzentrationen auftreten. In den durchgeführten Experimenten konnte eine messbare, strukturelle Änderung lediglich durch eine Erhöhung der Temperatur hervorgerufen werden. Da 25(OH)D bei höheren Temperaturen instabil wird und zerfällt, sollte von einem Assay bei erhöhter Temperatur abgesehen werden. Die Verwendung des Sandwich- oder Sandwich-ähnlichen Modus entfällt für die 25(OH)D-Assay-Entwicklung ebenfalls, da in diesem Modus 25(OH)D durch zwei Aptamere gebunden wird. Die in dem Sandwichassay verwendeten Aptamere erkennen unterschiedliche Epitope des Targets. In kleinen Molekülen ist die Anzahl der Bindungsstellen durch ihre molekulare Größe stark begrenzt, was die Entwicklung von diesem Modus erschwert. Auch die Verwendung eines Competitive Replacement-Modus (CR-Modus) ist nicht erstrebenswert, da hier das Zielmolekül immobilisiert werden muss. Für die Immobilisierung werden chemische Linker verwendet, welche an die vorhandenen funktionellen Gruppen des kleinen Moleküls gebunden werden. Dies grenzt die Verfügbarkeit von freien Gruppen für die Targeterkennung durch das Aptamer weiter ein. Besonders wenn die Targetbindung nur geringe strukturelle Änderungen verursacht, erscheint der TID-Modus vielversprechend. Dieser beruht auf der Verdrängung von komplementären Oligonukleotiden. Diese Oligonukleotide hybridisieren mit dem Aptamer vor der Zugabe des Targets. Wird das Target dann von dem Aptamer gebunden, werden die Oligonukleotide verdrängt. Der in dieser Dissertation etablierte TID-Assay beruht auf dem *signal-off*-Prinzip, da das fluoreszenzmarkierte, komplementäre Oligonukleotid bei Targetbindung verdrängt wird. In den folgenden Waschschritten wird es

von der Assayoberfläche gewaschen und anschließend die Abnahme der Fluoreszenzintensität bestimmt. Auch geringe strukturelle Änderungen stellen kein Problem dar, da hier die Transduktion durch die Verdrängung des Oligonukleotids erfolgt.

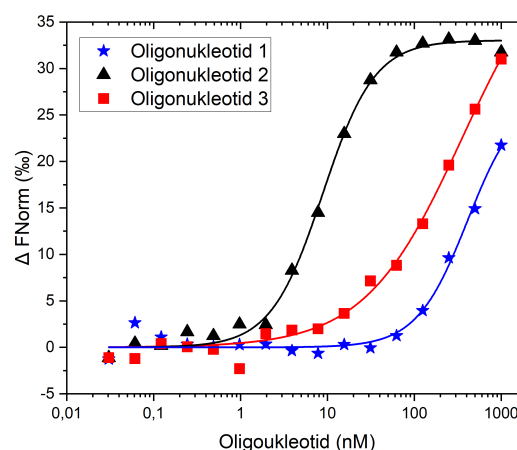
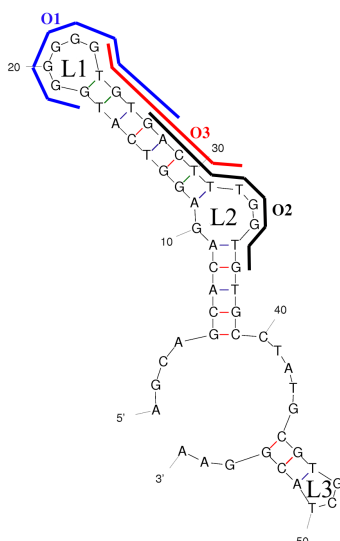
In den folgenden Kapiteln wird die Entwicklung eines TID-Assays für die Detektion von 25(OH)D gezeigt. Hierbei ist der erste Schritt die Identifizierung und Charakterisierung eines geeigneten, komplementären Oligonukleotids.

#### **4.2.1. Design der komplementären Oligonukleotide**

Die Ergebnisse aus dem Kapitel 4.1 zeigten, dass die Ausbildung des VDBA14-25(OH)D-Komplexes zu geringen strukturellen Änderungen im Aptamer führt. Es ist wahrscheinlich, dass 25(OH)D in den bereits vorhandenen Sekundär- und Tertiärstrukturen gebunden wird und es zu keiner strukturellen Umlagerung des Aptamers kommt. Durch die geringe Größe des Targets wird die Struktur von VDBA14 nicht bzw. nur in geringem Maße beeinflusst. Der 25(OH)D-Assay wurde auf Basis des TID-Assays entwickelt, welcher sich die Verdrängung von komplementären Oligonukleotiden bei Anwesenheit des Targets zu Nutze macht. Die Oligonukleotide können beispielsweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff gelabelt werden, sodass bei der Verdrängung durch das Target eine Signaländerung der Fluoreszenzintensität gemessen werden kann. Dabei ist die Verdrängung des Oligonukleotids proportional zur Analytenkonzentration. Der erste Schritt bei der Entwicklung eines TID-Assays ist das Design der komplementären Oligonukleotide. Anhand der Sekundärstruktur des Aptamers werden potentielle Oligonukleotidbindstellen identifiziert. Abb. 4.9a zeigt die durch mFold vorhergesagte VDBA14-Sekundärstruktur. In der Literatur wurde der Bereich zwischen der Haarnadelstruktur L1 und L2 als hochkonservierter Bereich für die 25(OH)D-Bindung bestimmt. Demnach ist dieser Bereich maßgeblich an der Targetbindung beteiligt [90]. Dieser Bereich des Aptamers wurde in den vorherigen Kapiteln als potentielle 25(OH)D-Bindestelle identifiziert, da sich bei der Targetbindung nur geringe strukturelle Änderungen ergaben und durch die Temperaturerhöhung hauptsächlich die Stem-Bereiche instabilisiert wurden. Bei dem Design eines TID-Assays ist die Länge der Oligonukleotide ein wichtiger Parameter, da die Länge direkt mit der Bindungsstärke an das Aptamer korreliert. So binden lange Oligonukleotide sehr stabil an das Aptamer und können durch die Hinzugabe des Targets nicht mehr verdrängt werden. Für die Entwicklung von TID-Assays sind kurze Oligos eher geeignet, da sie leichter durch das Target verdrängt werden können. Mit einer Oligonukleotidlänge von 10 nt konnte so ein hochsensitiver TID-Assay für die Detektion des kleinen Moleküls ATP entwickelt werden [91]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden drei Oligonukleotide mit einer Länge von 10 Nukleotiden als Ausgangspunkt

entworfen. Diese binden in dem Bereich der beiden Loop-Strukturen (L1, L2) und dem Stem-Bereich zwischen diesen. Oligonukleotid 1 (O1) deckt die G-reiche Haarnadelstruktur 1 (L1) ab, während Oligonukleotid 2 (O2) an den Bulge-Loop L2 bindet. Das komplementäre Oligonukleotid 3 (O3) bindet in dem Stammbereich (S1) zwischen den beiden Schleifen (Abb. 4.9a).

Oligonukleotid 1 (O1) 5'-Cy5-TCACACCCCC-3'  
Oligonukleotid 2 (O2) 5'-Cy5-CACCAAAGTC-3'  
Oligonukleotid 3 (O3) 5'-Cy5-AAAGTCACAC-3'



(a) Bindestellen der komplementären Oligonukleotide an VDBA14.

(b) Hybridisierungskurven der drei Oligonukleotide.

**Abb. 4.9.:** (a) Die drei komplementären Oligonukleotide O1-O3 wurden so erstellt, dass diese die vermutete Targetbinderegion von VDBA14 möglichst breit erfassen. (b) Interaktion der drei Oligonukleotide und VDBA14 bei 35 °C. Für die MST-Messung wurde das jeweilige Oligonukleotid zuvor seriell in Aptamerbindepuffer verdünnt. Anschließend wurde jede Verdünnungsstufe mit 10 nM 5'-Cy5-markierten VDBA14 (finale Konzentration) vermischt. Nach einer Inkubation von 1 h wurde die Interaktion der Biomoleküle bei 35 °C mittels MST vermessen. Die Hybridisierungskurve wurde mit der NT.Analysis Software generiert und in Origin 2018 bearbeitet.

**Tab. 4.2.:** Mittels MST ermittelte Kennzahlen der drei komplementären Oligonukleotide im Hybridisierungsversuch. Gezeigt ist die Dissoziationskonstante und die Konfidenz der ermittelten Dissoziationskonstante.

Oligonukleotid	$K_d$ (nM)	$K_d$ -Konfidenz
1	$\geq 91,41$	$\pm 238,02$
2	$\geq 2,69$	$\pm 0,76$
3	$\geq 194,01$	$\pm 129,32$

Eine MST wurde durchgeführt, um die Oligonukleotide hinsichtlich ihrer Affinität zu charakterisieren. Dafür wurde VDBA14 5'-Cy5-markiert und in mit einer finalen Konzentration von 10 nM eingesetzt. Das jeweilige Oligonukleotid wurde seriell verdünnt um einen möglichst breiten Konzentrationsbereich von 0,05 nM bis 1000 nM abzudecken. Die MST wurde bei 35 °C durchgeführt (Abb. 4.9b), da sich im vorherigen Kapitel bei dieser Temperatur eine Destabilisierung des Aptamers abgezeichnet hat. Dies ist für die Hybridisierung von Vorteil, da die komplementären Oligonukleotide so einfacher an das teils ungefaltete Aptamer binden können. Bei allen Oligonukleotiden konnte ein Bindungsereignis beobachtet werden. In der MST kann durch das Auftreten eines sigmoidalen Kurvenverlaufes auf die Interaktion der Bindungspartner geschlossen werden. Mit steigender Oligonukleotidkonzentration verlagert sich die Gleichgewichtsreaktion in Richtung des VDBA14-Oligonukleotid-Komplexes. Bei hohen Oligonukleotidkonzentrationen hat daher nahezu jedes Aptamermolekül ein komplementäres Oligonukleotid gebunden (hoher Anteil an gebundenen Bindungspartnern). Die Verwendung der komplementären Oligonukleotide 2 und 3 führte zu den größten Signalamplituden ( $\Delta F_{\text{Norm}}$ ) von bis zu 33 %. Oligonukleotid 1 führte bei der VDBA14-Hybridisierung zu einer Amplitude von 20 %. Mithilfe der MO.Affinity Software wurden anschließend Fittings durch die erhaltenen Datenpunkte zur Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) durchgeführt. Die  $K_d$  beschreibt in diesem Fall die Affinität des Oligonukleotids zu dem Aptamer. Für eine Zusammenfassung der MST-Ergebnisse siehe Tab. 4.2.

Oligonukleotid 2 besitzt, basierend auf der bestimmten Dissoziationskonstante, die höchste Affinität zu VDBA14. Dies zeigt sich durch eine  $K_d$  im niedrigen nanomolaren Bereich. Die  $K_d$  von O1 und O3 liegen wesentlich höher. Somit liegt das Bindungsgleichgewicht bei der VDBA14-O2-Interaktion eher auf der Seite des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes. Bei den anderen Oligonukleotiden O1 und O3 liegt das Gleichgewicht der Bindungsreaktion eher auf der Seite des ungebundenen Zustands. Mit der im vorherigen Kapitel bestimmten  $K_d$  der VDBA14-25(OH)D-Interaktion von 14,99 nM bedeutet dies, dass das Aptamer stark bevorzugt an das Target bindet und nicht bevorzugt an O1 und O3. Bei Oligonukleotid 2 ist es anders, da in diesem Fall die Affinität von VDBA14 zu O2 höher als zu 25(OH)D ist. Für die Entwicklung eines

TID-Assays lassen sich aus den Erkenntnissen der Hybridisierungsexperimente eine Reihe von Schlussfolgerungen ziehen.

Zum Einen ist es für den TID-Assay wichtig, dass möglichst viel komplementäres Oligonukleotid an das Aptamer bindet. Dadurch lässt sich durch die Zugabe des Targets auch viel Oligonukleotid verdrängen, was sich in einer erhöhten Sensitivität des Assays zeigt. Bindet das komplementäre Oligonukleotid jedoch zu stark an das Aptamer, kann das Target das Oligonukleotid nicht mehr effektiv verdrängen, was die Sensitivität des Assay wiederum herabsenkt. Die drei Oligonukleotide wurden im nächsten Schritt hinsichtlich ihrer Verdrängungseffektivität durch 25(OH)D evaluiert. Eine hohe Verdrängungsrate des Oligonukleotids durch das Target ist bei der Etablierung eines TID-Assays essentiell.

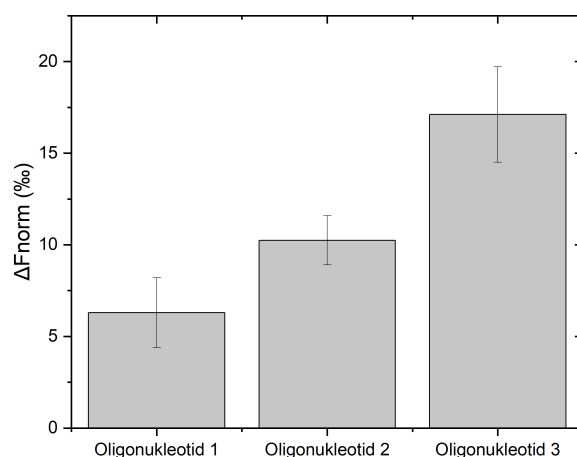
#### **4.2.2. Verdrängung der komplementären Oligonukleotide durch 25(OH)D**

Im vorherigen Kapitel 4.2.1 wurden drei komplementäre Oligonukleotide für die Entwicklung eines TID-Assays hinsichtlich ihres Hybridisierungsverhaltens mit dem 25(OH)D-bindenden Aptamer charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass das Oligonukleotide 2 mit einer sehr hohen Affinität an das Aptamer bindet. Für die korrekte Funktionsweise eines TID-Assays ist es unabdingbar, dass durch das Target eine nahezu vollständige Verdrängung des komplementären, an das Aptamer gebundenen Oligonukleotids, erfolgt. Für eine effiziente Targetdetektion im TID-Assay ist jedoch zu beachten, dass eine zu hohe Affinität des Oligonukleotids die Verdrängung durch das Target erschwert. Wohingegen eine zu geringe Affinität dazu führt, dass das Aptamer eher in der unhybridisierten Form vorliegt, wodurch eine Targetbindung bevorzugt wird, jedoch keine Verdrängung des markierten Oligonukleotids erfolgen kann. Dies trägt nicht zum Signal bei und beeinflusst somit die Sensitivität und Auswertbarkeit des Assays. Für die Assayentwicklung sind dies zwei entgegengesetzte Effekte, welche im Folgenden für alle drei Oligonukleotide betrachtet wurden.

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass VDBA14 das Target 25(OH)D mit einer hohen Affinität ( $K_d = 14,99 \text{ nM}$ ) bindet und dass die komplementären Oligonukleotide in der Lage sind, mit VDBA14 zu hybridisieren. Als nächster Schritt sollte nun gezeigt werden, dass die komplementären Oligonukleotide durch das Target auch verdrängt werden können. In einem weiteren MST-Experiment wurde die Verdrängung der 5'-Cy5-markierten, komplementären Oligonukleotide 1-3 untersucht. Als Positivkontrolle wurde  $1 \mu\text{M}$  25(OH)D verwendet. Dieser Ansatz wurde anschließend mit der Negativkontrolle verglichen, in der sich kein 25(OH)D befand. In diesem Ansatz sollte sich das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite



des VDBA14-Oligo-Komplexes befinden. Die strukturelle Änderung zwischen diesen Ansätzen wurde anschließend durch die Änderung der Amplitude ( $\Delta F_{\text{Norm.}}$ ) evaluiert (Abb. 4.10).

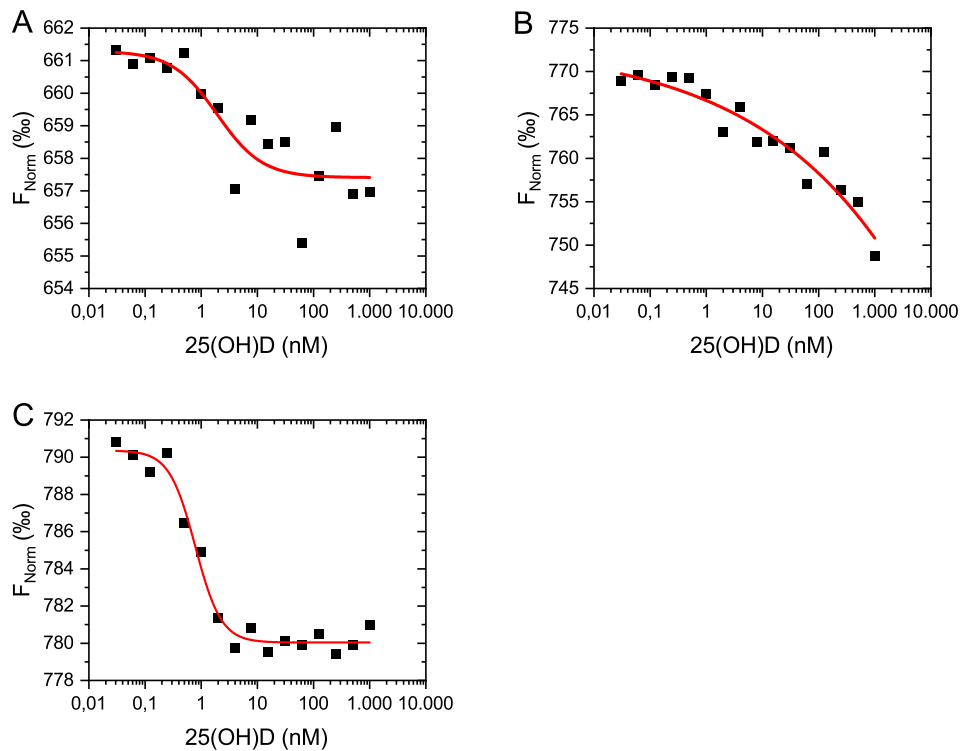


**Abb. 4.10.:** Verdrängung der komplementären Oligonukleotide bei hohen 25(OH)D-Konzentrationen in der MST. Um die Verdrängung der Oligonukleotide durch 25(OH)D einschätzen zu können, wurde ein MST-Experiment durchgeführt. Dafür wurde eine hohe 25(OH)D-Konzentration von  $1\ \mu\text{M}$  verwendet, welche die Positivkontrolle darstellte. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne 25(OH)D hergestellt, welcher lediglich VDBA14 und 5'-Cy5-markiertes Oligonukleotid enthielt. Anschließend wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität (FNorm) zwischen der Positiv- und Negativkontrolle in Relation gesetzt und die Änderung der Fluoreszenzintensität gegen das jeweilige Oligonukleotid aufgetragen ( $\Delta F_{\text{Norm}}$ ). Die Ansätze wurden in Aptamerbindepuffer mit 10 % (v/v) Ethanol angesetzt und anschließend in der MST bei  $35\ ^\circ\text{C}$  analysiert. Für jedes der drei Oligonukleotide wurde das MST-Experiment dreimal wiederholt ( $N = 3$ ) und aus der Standardabweichung die Fehlerbalken gebildet.

Die höchste strukturelle Änderung bei Anwesenheit von  $1\ \mu\text{M}$  25(OH)D lässt sich bei der Verwendung von Oligonukleotid 3 erkennen. Dort konnte eine Amplitude von 17 % beobachtet werden. Die zweithöchste Verdrängung konnte bei der Verwendung von Oligonukleotid 2 beobachtet werden. Dort wurde eine Amplitude von 10 % erreicht. Die geringste Verdrängung konnte bei der Verwendung von Oligonukleotid 1 beobachtet werden. Im Rahmen dieses Vorversuches konnte bei allen drei komplementären Oligonukleotiden eine Verdrängung des Oligonukleotids bei hohen 25(OH)D-Konzentrationen von  $1\ \mu\text{M}$  beobachtet werden. Dabei führte die Verwendung des Oligonukleotids 3 zu der stärksten Verdrängung bei einer hohen 25(OH)D-Konzentration.

Für die spätere Detektion von 25(OH)D in Serum muss der TID-Assay auch Konzentrationen im niedrigen, nanomolaren Bereich (50 nM bis 100 nM 25(OH)D) nachweisen können, sodass in

diesem Konzentrationsbereich auch eine Oligonukleotidverdrängung zu beobachten sein sollte. Daher wurde erneut ein MST-Experiment durchgeführt, um diesen relevanten 25(OH)D-Konzentrationsbereich abzudecken. 10 nM VDBA14 und das zu untersuchende, 5'-Cy5-markierte Oligonukleotid 1-3 (finale Konzentration 10 nM) wurden vermischt. Anschließend wurde die VDBA14-Oligonukleotidlösung zu den verschiedenen 25(OH)D-Verdünnungsstufen gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h (kompetitiver TID) erfolgte die Messung mit der MST bei 35 °C. Abb. 4.11 zeigt das Ergebnis dieser MST.



**Abb. 4.11.:** Verdrängung der komplementären Oligonukleotide durch 25(OH)D. Die Verdrängung der drei komplementären Oligonukleotide wurde mittels MST bestimmt. Für die MST-Messung wurde 25(OH)D zuvor seriell in Aptamerbindepuffer mit 10 % (v/v) Ethanol verdünnt. Anschließend wurde jede Verdünnungsstufe mit 10 nM 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotid (finale Konzentration) vermischt und das Gemisch zu dem unmarkierten VDBA14 gegeben (finale Konzentration 10 nM VDBA14, 10 nM Oligonukleotid). Es handelte sich somit um einen kompetitiven TID-Ansatz. Nach einer Inkubation von 1 h wurde die Verdrängung der komplementären Oligonukleotide bei 35 °C mittels MST bestimmt. Die Bindungskurven wurde mit der NT.Analysis Software generiert und in Origin 2018 bearbeitet. **A** Verdrängung des komplementären Oligonukleotids 1. **B** Verdrängung des komplementären Oligonukleotids 2. **C** Verdrängung des komplementären Oligonukleotids 3.

**Tab. 4.3.:** Mittels MST ermittelte Kennzahlen der drei komplementären Oligonukleotide im TID-Assay. Gezeigt ist die Amplitude nach dem Fitting einer Bindungskurve, die Dissoziationskonstante und die Konfidenz der ermittelten Dissoziationskonstante.

Oligonukleotid	Amplitude (AU)	Scheinbare $K_d$ (nM)	$K_d$ -Konfidenz
1	3,45	$\geq 5$	$\pm 6,57$
2	20,24	$\geq 10$	$\pm 3,46$
3	10,12	$\geq 1$	$\pm 801,61$

Oligonukleotid 1 (Abb. 4.11 A), Oligonukleotid 2 (Abb. 4.11 B) und Oligonukleotid 3 (Abb. 4.11 C) zeigen bei steigenden 25(OH)D-Konzentrationen eine absinkende Fluoreszenzintensität. Dabei lässt sich bei Oligonukleotid 1 und Oligonukleotid 3 das Erreichen einer Sättigung ab ca. 10 nM 25(OH)D beobachten. Bei der Verwendung von Oligonukleotid 2 lässt sich sowohl bei niedrigen 25(OH)D, als auch bei hohen 25(OH)D-Konzentrationen kein Einstellen eines Sättigungseffektes beobachten.

Bei allen drei untersuchten Oligonukleotiden lässt sich ein 25(OH)D-abhängiger Effekt der Oligonukleotidverdrängung erkennen. Für den TID-Assay bedeutet dies, dass theoretisch alle drei Oligonukleotide einsetzbar wären, da sie auf eine 25(OH)D-Konzentrationsänderung mit der Verdrängung der Oligonukleotide reagieren. In den Verdrängungskurven ist ersichtlich, dass die Verwendung des Oligonukleotids 2 zu einem breiten dynamischen Bereich der 25(OH)D-Detektion verwendet werden könnte. Dies zeigt sich durch eine konzentrationsabhängige Verdrängungsreaktionen über die gesamte getestete 25(OH)D-Verdünnungsreihe. Dagegen würde die Verwendung von Oligonukleotid 3 zu einem besonders sensitiven Assay führen, da es im Bereich von 0,1 nM bis 10 nM 25(OH)D bei geringen Konzentrationsänderungen zu einer starken Änderung der Fluoreszenzintensität (entspricht der Verdrängung) kommt. Für eine Zusammenfassung der in der MST ermittelten Kennzahlen für die TID-Reaktion siehe Tab. 4.3.

Für die erfolgreiche Verwendung des TID-Assays bei der späteren Detektion von 25(OH)D ist der Konzentrationsbereich, in dem es zu einer Verdrängung kommt, von entscheidender Bedeutung. Diese als Auflösung bezeichnete Kennzahl eines Biosensors gibt an, in welchem Konzentrationsbereich eine sichtbare Veränderung des Signal zu beobachten ist [92]. Werden nun die Kurvenverläufe von O2 und O3 miteinander verglichen, zeigt sich, dass O2 im TID-Ansatz über ein breites 25(OH)D-Konzentrationspektrum (1000 nM bis 0,1 nM) mit der Verdrängung des Oligonukleotids reagiert. O3 hingegen zeigt einen schmalen Konzentrationsbereich, in dem die Verdrängungsreaktion statt findet (0,5 nM und 5 nM). 25(OH)D-Konzentrationen in klinischen Proben liegen im Bereich von circa 50 nM bis 150 nM [9]. Somit würde die Verwendung von O2 in einem TID-Assay zur Detektion von 25(OH)D in diesem Konzentrati-

onsbereich eher geeignet sein, da die Verdrängungsreaktion über einen breiteren 25(OH)D-Konzentrationsbereich zu beobachten ist.

Durch den Vergleich der drei komplementären Oligonukleotide konnte in einem ersten TID-Experiment in der MST gezeigt werden, dass die Verwendung von Oligonukleotid 2 sowohl zu der höchsten Oligoverdrängung, als auch zu dem vermeintlich breitesten dynamischen Bereich für die 25(OH)D-Detektion führte. Für die weiteren Experimente im Microarrayformat wurde somit Oligonukleotid 2 verwendet.

### **4.3. Immobilisierung von VDBA14 im Microarray-Format**

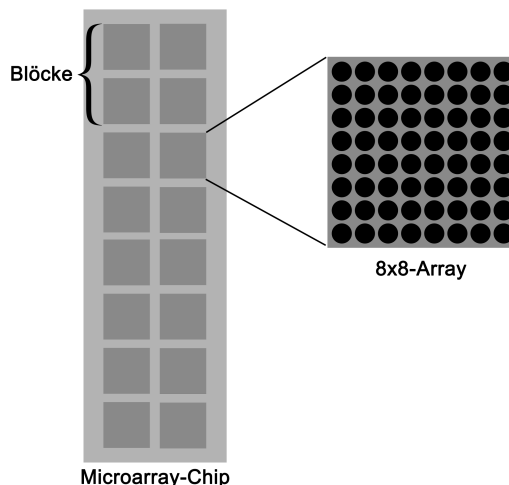
In den vorherigen Kapiteln wurden die VDBA14-25(OH)D-Interaktion ohne die Immobilisierung eines Bindungspartners durchgeführt. In diesem Kapitel werden diese Interaktionen auch im immobilisierten Zustand analysiert. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines TID-Assays, welcher sich für den späteren Einsatz in Biosensoren für die Detektion von 25(OH)D im POCT-Maßstab eignet. Dafür ist häufig die Immobilisierung des Aptamers nötig, um die Aptamere beispielsweise in der späteren Anwendung einfacher regenerieren zu können. Weiterhin vereinfacht eine Aptamerimmobilisierung das Handling des Biosensors und so sind beispielsweise auch Schnelltests möglich (z.B. Lateral Flow-Assays). Da die Immobilisierung von Aptameren die Funktionalität und Affinität negativ beeinflussen kann, müssen die Auswirkungen dieser Immobilisierungsschritte sorgfältig evaluiert werden. Bei der Entwicklung von optischen, aptamerbasierten Biosensoren ermöglicht das Microarrayformat eine schnelle und parallele Analyse von Bindungsinteraktionen in verschiedenen Versuchsbedingungen und ob das Aptamer auch im immobilisierten Zustand das Target binden kann. Für die Durchführung eines Microarrays wird das Aptamer kovalent auf einer Oberfläche immobilisiert. Nach Untersuchung der optimalen Immobilisierungsbedingungen wurde der in Kapitel 4.2.2 etablierte TID-Assay für die Detektion von 25(OH)D auch im Microarrayformat durchgeführt. Abschließend wurde der TID-Assay hinsichtlich der Sensitivität, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze evaluiert und mit einem etablierten Assay verglichen.

#### **4.3.1. Immobilisierung**

Die Verwendung der DNA-Chip-Analyse (DNA-Microarray) ist eine etablierte Methode zur Untersuchung der Interaktion von DNA-Molekülen mit einer Reihe von anderen Biomolekülen. Dabei wird die DNA auf einer Oberfläche immobilisiert und es können auf einem Chip eine Vielzahl von Interaktionen detektiert werden. Auch die Evaluierung von verschiedenen expe-

rimentellen Bedingungen ist so möglich, da sich auf der Chipoberfläche räumlich getrennte Reaktionskammern generieren lassen.

Für die Verwendung von Aptameren in TID-Assays ist es üblich, dass einer der Bindungspartner auf einer Oberfläche immobilisiert wird. Diese Immobilisierung verbessert das Handling des Assays und ermöglicht so die Regeneration des Aptamers für eine mehrfache Verwendung [93] in späteren Aptasensor-Anwendungen. Auch Aptamere können mithilfe der DNA-Microarraytechnologie analysiert werden, sodass sich dieses System besonders für die Optimierung des etablierten TID-Assays anbietet. Dafür wurde VDBA14 auf einer modifizierten Glasoberfläche immobilisiert. Die Oberfläche des Microarraychips wurde mit einer Aldehydfunktionalisierung versehen, welche bei der Aptamerimmobilisierung verwendet wird. Die in dieser Dissertation verwendeten Microarraychips wurden so hergestellt, dass 16 Reaktionsräume (auch Blöcke genannt) entstanden. Diese Blöcke (dunkelgrau) verfügen über die Aldehydgruppen, welche dann mit der terminalen Aminomodifikation des Aptamers eine Iminbindung ausbilden können. Ein Block wiederum verfügt über eine 8x8-Matrix, wodurch sich insgesamt 64 Plätze für verschiedene Aptamerkonzentrationen ergeben. Diese Spots werden durch ein präzises Spottingverfahren auf die Chips aufgebracht. Ein typisches Microarray-Layout ist in Abbildung 4.12 gezeigt.



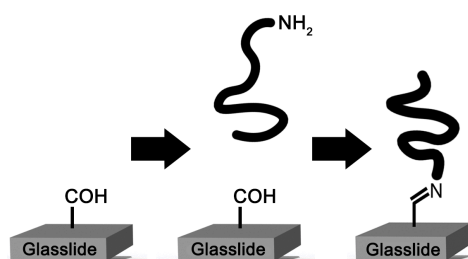
**Abb. 4.12.:** Schematischer Aufbau eines Microarraychips. Der Chip ist in 16 Blöcke aufgeteilt, wobei jeder Block aus einem 8 x 8-Subarray besteht. Jeder schwarze Punkt entspricht einer möglichen Aptamerkonzentration.

Bei dem Immobilisierungsvorgang kann jeder der Spots eines Blocks mit der gewünschten Aptamerkonzentration versehen werden. Auch weniger Konzentrationen mit mehrfachen Replikaten sind so realisierbar. Auch sind innerhalb der Blöcke Aptamerverdünnungsreihen möglich.

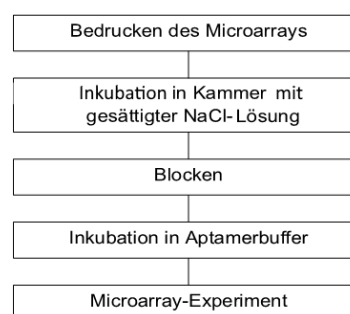
Die 16 Blöcke lassen sich durch eine geeignete Hybridisierungskammer (NEXTERION) in 16 separate Reaktionsräume unterteilen sind voneinander getrennte Reaktionskammern. Dadurch lassen sich pro Block verschiedene Pufferbedingungen testen und dann zwischen den Blöcken miteinander vergleichen. So lassen sich durch die Durchführung eines Microarray-Experiments parallel und mit geringem Materialverbrauch eine Reihe an Optimierungen durchführen.

### 4.3.2. Immobilisierungsoberfläche

Bei der Immobilisierung von VDBA14 auf der Microarrayoberfläche wird zwischen den Aldehydgruppen der Oberfläche und dem Aptamer eine kovalente Bindung gebildet. Hierfür wurde das Aptamer vorher mit einer 5'-NH<sub>2</sub>-Gruppe versehen. Diese Modifikation erfolgt während der Aptamersynthese (Abb. 4.13a)



(a) Ablauf der Immobilisierung von VDBA14 auf aldehydmodifizierten Microarraychips.



(b) Experimenteller Ablauf der VDBA14-Immobilisierung Aldehydmodifizierten Glasslides.

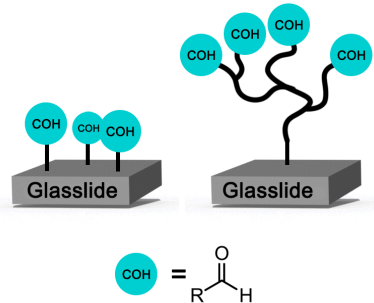
**Abb. 4.13.:** Immobilisierungsvorgang von VDBA14. (a) Schematischer Ablauf der Aptamerimmobilisierung auf einem Microarray. Durch die 5'-NH<sub>2</sub>-Modifizierung des Aptamers kann eine Iminbildung zwischen Aptamer und der aldehydmodifizierten Microarrayoberfläche ausgebildet werden. (b) Schematischer Ablauf der Immobilisierungsschritte. Das Aptamer wird mithilfe eines NanoSpotters auf die Microarraychips gedruckt. Anschließend werden die Chips für bis zu 24 Stunden in einer Kammer mit gesättigter NaCl-Lösung gelagert. Nach dem Trocknen werden die Chips mit einer NaBH<sub>4</sub>-Lösung geblockt, um die restlichen Aldehydgruppen zu reduzieren. Der letzte Schritt ist die Inkubation des gesamten Chips in Aptamerbindepuffer, um eine korrekte Faltung des Aptamers zu gewährleisten. Anschließend kann das eigentliche Microarray-Experiment gestartet werden.

Der Ablauf der Immobilisierung von VDBA14 ist in Abbildung 4.13b gezeigt. Nachdem der Microarray mit dem Aptamer bedruckt wurde, wurde der gesamte Chip für 24 Stunden in einer Kammer mit gesättigter NaCl-Lösung inkubiert. Dadurch wurde in der Kammer eine Luftfeuchtigkeit von ca. 70 % eingestellt, was ideale Reaktionsbedingungen für die Aptamerimmobilisierung darstellt. Nach Ablauf der Zeit erfolgt das Abblocken der Oberfläche. Hierfür wird NaBH<sub>4</sub>

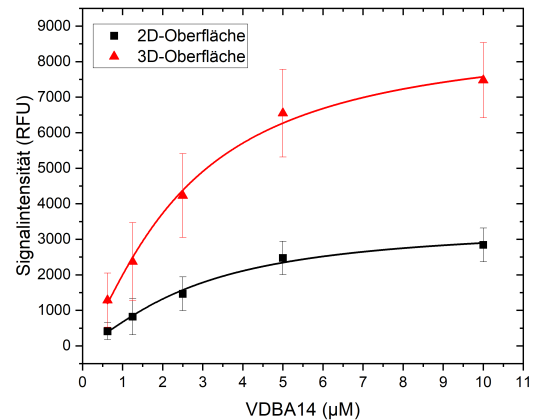
verwendet, welches die Aldehydgruppen der Oberfläche reduziert, die keine kovalente Bindung mit dem Aptamer eingegangen sind. So können unspezifische Wechselwirkungen bei den Microarrayexperimenten minimiert werden. Weiterhin senkt  $\text{NaBH}_4$  die Hintergrundfluoreszenz des Chips, welche durch die Herstellungsprozesse entstehen kann [94]. Der letzte Schritt, bevor das eigentliche Microarrayexperiment startet, ist die Inkubation des gesamten Chips mit Aptamerbindepuffer. Dies ist in der Regel der Puffer, welcher während der Aptamerselektion verwendet wurde. Normalerweise repräsentiert dieser Puffer die optimalen Bedingungen für eine korrekte Faltung des Aptamers. In diesem Schritt faltet sich das Aptamer in seine korrekte Sekundär- und Tertiärstruktur und kann anschließend das Target binden. Das Microarrayexperiment kann nun durchgeführt werden.

Der Immobilisierungsschritt ist ein kritischer Schritt während der Entwicklung eines optischen TID-Assays im Microarrayformat. So kann die Immobilisierung zu Fehlfaltungen des Aptamers führen, was zu einer verringerten Aptamer-Target-Affinität führt. Auch die Immobilisierungsfläche kann die Aptamerfunktionalität negativ beeinträchtigen. Durch die räumliche Nähe von Oberfläche und Aptamer können Fehlfaltungen im Aptamer entstehen. Um eine effektive Immobilisierung zu garantieren, wurden deshalb zwei aldehydmodifizierte Oberflächen untersucht. Es gibt neben den klassischen, kurzkettigen Linkern auch stark verzweigte, lange Linker. Durch diese dreidimensionale Verzweigung entsteht eine Struktur mit großer Oberfläche, weshalb diese Variante auch 3D-Oberfläche genannt wird. Vorteile dieser Struktur sind eine wesentlich höhere Immobilisierungskonzentration und somit auch ein höheres Detektionssignal. Abbildung 4.14a zeigt den Aufbau dieser 2D- und 3D-Oberflächen.

Um die Effektivität der Immobilisierung von 2D- und 3D-Oberflächen miteinander zu vergleichen, wurde das 25(OH)D-Aptamer auf der jeweiligen Oberfläche immobilisiert und nach Färbung des Aptamers über die erhaltene Fluoreszenzintensität ausgewertet. Die Fluoreszenzfärbung des Aptamer erfolgte durch eine SYBR<sup>®</sup> Green I/II-Lösung. SYBR<sup>®</sup> Green I dient der Anfärbung von dsDNA, wohingegen SYBR<sup>®</sup> Green II ssDNA anfärbt. Da sich in dem verwendeten VDBA14 sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA-Strukturen befinden, wurde ein Mix der beiden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Die Verwendung der 3D-Oberfläche führte zu dreimal höheren Fluoreszenzintensitäten, weshalb für die weiteren Experimente diese Oberfläche verwendet wurde (Abb. 4.14b). Durch die verzweigte Oberfläche sind mehr Aldehydgruppen pro Fläche für die Aptamerimmobilisierung verfügbar, was sich in einer erhöhten Fluoreszenzintensität äußert. Dies ist besonders bei hohen VDBA14-Konzentrationen zu beobachten, da so eine höhere VDBA14-Immobilisierungskonzentration immobilisiert werden kann, ohne dass sich eine Sättigung einstellt. Bei der Verwendung der 2D-Oberfläche ist eine Aptamersättigung bereits ab  $10\text{ }\mu\text{M}$  VDBA14 erreicht. Eine Maximierung der VDBA14-Immobilisierungskonzen-



(a) Aufbau von 2D- (links) und 3D-Aldehydoberflächen (rechts) für die Immobilisierung von Aptameren.



(b) Einfluss der 2D- und 3D-Aldehydoberfläche auf die Immobilisierungseffizienz von VDBA14.

**Abb. 4.14.:** (a) Schematischer Aufbau von 2D und 3D-Aldehyd-Oberflächen für die Verwendung in Microarray-Experimenten. Die Oberfläche von Glasslides ist über Linker mit Aldehydgruppen versehen. Diese Linker sind entweder kurzketig (2D-Oberflächen) oder langketig und verzweigt (3D-Oberflächen). (b) Fünf VDBA14-Konzentrationen im Bereich von 0,6 μM bis 10 μM wurden in 3x SSC-Puffer auf einer 3D- bzw. 2D-Aldehydoberfläche immobilisiert. Anschließend wurden die Microarrays mit einer SYBR® Green I/II-Lösung in PBS-Puffer für 15 min angefärbt. Nach Ablauf der Zeit wurde der gesamte Chip mit PBS-Puffer gewaschen, getrocknet und die Fluoreszenzintensität mittels GenePix-Scanner und GenePix-Software ausgewertet. Die Signalintensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zu der VDBA14-Immobilisierungskonzentration auf dem Microarraychip. Die finale Bearbeitung erfolgte in Origin 2018.

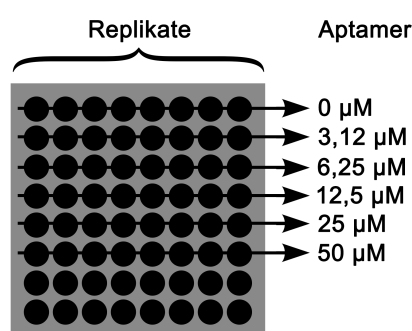
tration auf der Oberfläche ist von Vorteil, da sich dies in einem maximierten Signal für die spätere Targetdetektion zeigt. Im nächsten Kapitel wurde die maximale Immobilisierungskonzentration des Aptamers auf der Sensoroberfläche bestimmt, da bei der Verwendung von bis zu 10 μM VDBA14 keine Sättigung der Oberfläche beobachtet werden konnte.

### 4.3.3. Immobilisierungskonzentration

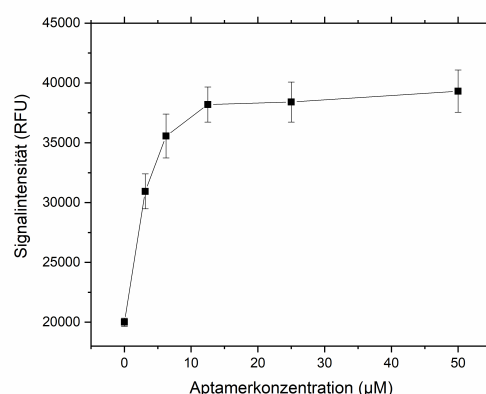
Der Detektionsbereich eines Assays ist maßgeblich abhängig von der Immobilisierungskonzentration des Aptamers auf der Sensoroberfläche. Dabei führt eine höhere Konzentration von immobilisierten Aptameren zu einer größeren Bindungskapazität und dementsprechend zu einem höheren transduzierten Signal des Biosensors. Ab einer bestimmten VDBA14-Immobilisierungskonzentration ist jedoch eine Sättigung der Sensoroberfläche erreicht und es können keine weiteren Aptamere immobilisiert werden. Um diese Aptamersättigung zu untersuchen,



wurde ein Microarray-Experiment mit verschiedenen Aptamerkonzentrationen durchgeführt. Fünf Aptamerkonzentrationen im Bereich von  $50\ \mu\text{M}$  bis  $0\ \mu\text{M}$  in  $3\times$  SSC-Puffer wurden auf einem 3D-Microarray-Chip immobilisiert und die Nukleotide der Aptamere anschließend mittels SYBR<sup>®</sup> Green I/II angefärbt. Die Fluoreszenzintensität ist somit proportional zur Immobilisierungskonzentration des Aptamers. Der Mittelwert der Fluoreszenzintensität von acht Replikaten je Aptamerkonzentration (siehe Abb. 4.15a) wurde anschließend gegen die Aptamerkonzentration aufgetragen, um eine Sättigungskurve zu erhalten (Abb. 4.15b).



(a) Schematische Anordnung eines Microarray-Blocks für die Bestimmung der Sättigungskonzentration von VDBA14.



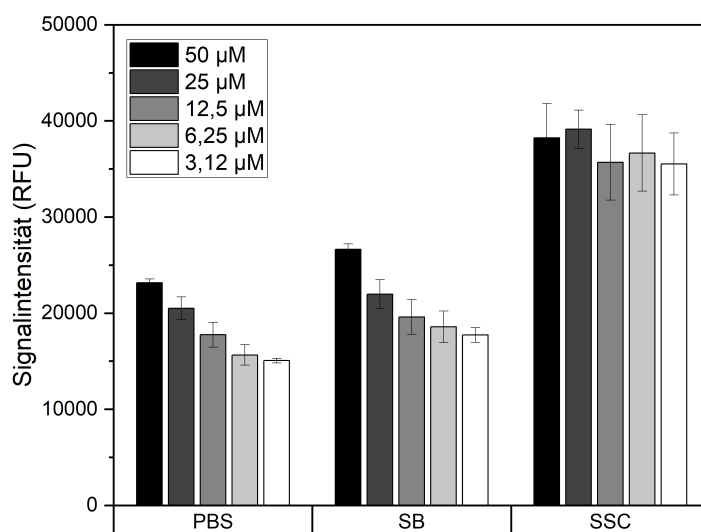
(b) Sättigungskurve von VDBA14 auf einem 3D-Microarraychip.

**Abb. 4.15.:** (a) Für die Durchführung des Microarrays wurden fünf VDBA14-Konzentrationen mit jeweils acht Replikaten pro Block auf der Microarrayoberfläche in  $3\times$  SSC-Puffer immobilisiert. Anschließend wurden die Aptamere mit einer SYBR<sup>®</sup> Green I/II-Lösung in PBS-Puffer für 15 min angefärbt. Anschließend wurde der gesamte Chip mit PBS-Puffer gewaschen, getrocknet und Fluoreszenzintensität mittels GenePix-Scanner und GenePix-Software ausgewertet. (b) Ergebnis des Microarray-Experimentes zur Bestimmung der Sättigungskonzentration. Die Signalintensität wurde mittels GenePix-Scanner und Software ausgewertet und gegen die verwendete VDBA14-Immobilisierungskonzentration aufgetragen. Die finale Bearbeitung erfolgte in Origin 2018.

Mit steigender Aptamerkonzentration auf der 3D-Aldehydoberfläche konnte ebenfalls ein Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Dies war zu erwarten, da mit steigender VDBA14-Immobilisierungskonzentration mehr auch mehr Nukleotide für die Anfärbung durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Green I/II zur Verfügung stehen. Ab einer Aptamerkonzentration von  $12,5\ \mu\text{M}$  ist ein Abflachen der Kurve zu beobachten. Daher ist ab dieser VDBA14-Konzentration keine weitere Immobilisierung von Aptameren auf der 3D-Oberfläche möglich und es stellt sich ein Sättigungseffekt ein.

Neben der gewählten Aptamerkonzentration für die Immobilisierung hat auch der Puffer, welcher während der Immobilisierung verwendet wird, einen Einfluss auf die Effektivität der Immobilisierung. Aptamere sind durch ihr Phosphodiester-Rückgrat stark negativ geladen, wodurch die verschiedenen Pufferbedingungen einen erheblichen Einfluss auf Aptamerfaltung und Struktur haben. Die positiv geladenen monovalenten und divalenten Kationen, welche häufig in Aptamerbindepuffern zu finden sind, können elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Immobilisierungsoberfläche und Aptamer vermitteln [95]. Ein weiterer möglicher pufferabhängiger Effekt ist die Schnelligkeit der Austrocknung, während des Immobilisierungsvorganges. Weiterhin ist es möglich, dass das Aptamer im Selektionspuffer in bereits gefalteter Form immobilisiert wird (bzw. mit vorgefalteten Strukturelementen). Dies wäre für die spätere Aptamerfunktionalität besonders günstig. Daher wurde die Immobilisierung von VDBA14 hinsichtlich des verwendeten Puffers optimiert. Während des Transfervorgangs auf die Chipoberfläche wurden drei verschiedene Puffer untersucht. Dafür wurden fünf VDBA14-Konzentrationen in Aptamerselektionspuffer (SB), PBS-Puffer (PBS) und 3x SSC-Puffer (SSC) gelöst und anschließend auf die Chipoberfläche transferiert. 3x SSC-Puffer wird standardmäßig in DNA-Hybridisierungsexperimenten und auch DNA-Immobilisierungen verwendet und wird somit auch für Microarrays empfohlen. Der Aptamerbindepuffer (auch Selektionspuffer) wurde während des SELEX-Verfahrens bei der Selektion von VDBA14 verwendet. Dieser Puffer sorgt für die korrekte Aptamerfaltung und Targetbindung. Der Bindepuffer enthält TRIS, welches mit den Aldehydgruppenen der Microarray-Oberfläche reagieren kann und sich somit auch auf die Immobilisierung auswirken kann. PBS-Puffer wird neben 3x SSC-Puffer ebenfalls häufig in Microarrayexperimenten eingesetzt. Fünf VDBA14-Konzentrationen im Bereich von 50  $\mu\text{M}$  bis 3,12  $\mu\text{M}$  wurden in den drei Puffern gelöst und auf der Oberfläche immobilisiert. Anschließend erfolgte die Anfärbung der Nukleotide mittels SYBR<sup>®</sup> Green I/II in PBS-Puffer. Die Fluoreszenzintensität wurde anschließend mittels GenePix Scanner gemessen (Abb. 4.16) und entspricht der Immobilisierungseffizienz. Die Höhe der Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zu der Effizienz der Immobilisierung in dem jeweiligen Puffer.

Geringere Aptamerkonzentrationen auf der Microarrayoberfläche führen zu niedrigeren Fluoreszenzintensitäten bei der SYBR<sup>®</sup> Green I/II-Färbung, als bei hohen VDBA14-Konzentrationen. Je mehr SYBR<sup>®</sup> Green I/II-Moleküle an die Nukleotide des Aptamers binden können, desto höher ist die Fluoreszenzintensität. Somit kann die Fluoreszenzintensität als ein Maß für die Effektivität der Immobilisierung angesehen werden. Bei allen getesteten Puffer kann eine Abnahme der Fluoreszenzintensität mit sinkender Aptamerkonzentration beobachtet werden, was erwartet wurde, da bei sinkender VDBA14-Konzentration weniger Nukleotide für die Anfärbung zur Verfügung stehen. Weiterhin führt die Verwendung des 3x SSC-Puffers zu den



**Abb. 4.16.:** Einfluss des, während der Immobilisierung, verwendeten Puffers auf die Fluoreszenzintensität. Um den Einfluss von verschiedenen Puffern während des Spotting-Vorgangs zu überprüfen, wurden fünf VDBA14-Immobilisierungskonzentrationen von 50 µM bis 3 µM verwendet. Die jeweilige VDBA14-Konzentration wurde dazu in PBS-Puffer, Aptamerbindepuffer und 3x SSC-Puffer gelöst und anschließend für den Immobilisierungsvorgang auf 3D-Microarrays verwendet. Anschließend erfolgte die Anfärbung von immobilisiertem VDBA14 mit einer SYBR® Green I/II-Lösung in PBS-Puffer für 15 min. Der gesamte Chip wurde dann mit PBS-Puffer gewaschen, getrocknet und die Fluoreszenzintensität mittels GenePix-Scanner und GenePix-Software ausgewertet. Die Stärke der Signalintensität ist proportional zur Immobilisierungseffizienz im jeweils verwendeten Puffer. Die finale Bearbeitung erfolgte in Origin 2018.

höchsten Signalintensitäten bei allen getesteten VDBA14-Konzentrationen. Wird die Signalintensität bei beispielsweise 50 µM VDBA14 zwischen den drei verwendeten Puffern verglichen, führt die Verwendung des SSC-Puffers zu einer wesentlich höheren Immobilisierungseffizienz (38 000 RFU). PBS- und Aptamerbindepuffer zeigen bei dieser VDBA14-Konzentration ähnlich niedrige Werte im Bereich von 22 000 bis 26 000 RFU. Der Aptamerbindepuffer enthält TRIS, was mit den Aldehydfunktionen der Immobilisierungsfläche wechselwirkt. Dies führt wahrscheinlich zu einer verringerten Immobilisierungseffizienz.

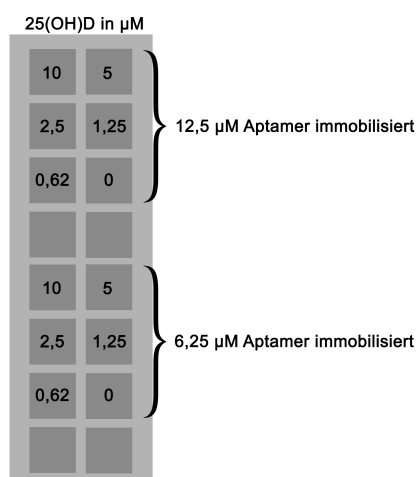
Für die spätere Verwendung des immobilisierten VDBA14 sind möglichst hohe VDBA14-Konzentrationen auf der Oberfläche von Vorteil. Eine maximierte VDBA14-Immobilisierungskonzentration auf der Oberfläche führt zu einer erhöhten Sensitivität des Assays, durch eine erhöhte Bindungskapazität der Aptamere. In Kapitel 4.3.3 konnte der Sättigungspunkt bei der

Immobilisierung in 3x SSC-Puffer auf 3D-Aldehyd-Microarrays bei 12,5  $\mu$ M VDBA14 identifiziert werden. Somit ergeben sich für die weiteren Microarrayexperimente als optimale Bedingungen die Verwendung von 12,5  $\mu$ M VDBA14 in 3x SSC-Puffer während des Transfervorgangs auf die 3D-Microarray-Oberfläche.

In den vorherigen Kapiteln wurde der Einfluss von verschiedenen Parametern während der Immobilisierung überprüft. Hierbei wurden sowohl Pufferzusammensetzung, als auch die VDBA14-Immobilisierungskonzentration hinsichtlich einer maximalen Fluoreszenzintensität optimiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine VDBA14-Konzentration am Sättigungspunkt von 12,5  $\mu$ M zu den höchsten Fluoreszenzintensitäten führt. Durch eine Aptamersättigung auf der Oberfläche könnte es jedoch zu intermolekularen sterischen Hinderungen zwischen den immobilisierten Aptameren kommen. Dies könnte die Bindungsaffinität durch Fehlfaltungen erheblich einschränken. Im nächsten Kapitel wurde daher die Aptamerfunktionalität nach der Immobilisierung überprüft.

#### **4.3.4. Funktionalität von VDBA14 nach Immobilisierung**

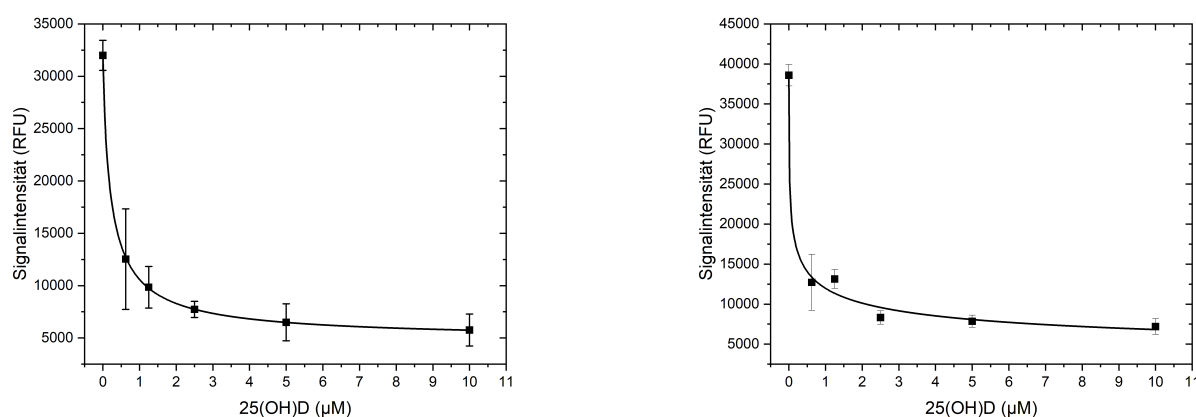
In Kapitel 4.3.3 wurde gezeigt, dass durch hohe VDBA14-Konzentrationen während der Immobilisierung hohe Fluoreszenzintensitäten von bis zu 40 000 RFU erreicht werden. Hierbei ist zu beachten, dass die VDBA14-Immobilisierungskonzentration auf der Oberfläche die Funktionalität des Aptamers beeinflussen kann. Hohe VDBA14-Immobilisierungskonzentrationen führen zu sterischen Hinderungen zwischen Aptameren, aber auch zwischen Aptameren und Immobilisierungsoberfläche führen. Diese sterischen Hinderungen setzen die Fähigkeit des Aptamers das Target zu binden drastisch herab, da es gegebenenfalls nicht mehr in der Lage ist, die korrekte dreidimensionale Struktur einzunehmen. Diese Struktur ist jedoch nötig, um das Target mit einer hohen Affinität zu binden. Weiterhin kann die Oligonukleotid-Hybridisierung durch eine zu hohe VDBA14-Immobilisierungskonzentration negativ beeinflusst werden. Dies würde im späteren TID-Assay zu einer geringen Verdrängungseffizienz der Oligonukleotide führen, da weniger Oligonukleotide hybridisieren können. Die Hybridisierung kann zum Einen durch die sterische Hinderung der Aptamere verhindert werden. Zum Anderen führt die stark negative Ladung der Phosphodiester-Rückgräte bei hohen VDBA14-Immobilisierungskonzentrationen zu einer verringerten Hybridisierungs-Effizienz der ebenfalls negativ geladenen Oligonukleotide. Eine weitere Einschränkung ergibt sich durch die Verwendung des Immobilisierungslinkers (hier 5'-NH<sub>2</sub>). Befindet sich beispielsweise das Aptatop in der Nähe des Immobilisierungslinkers, beeinträchtigt dies ebenfalls die Affinität des Aptamers.



**Abb. 4.17.:** Schematischer Aufbau des Microarraychips für die Bestimmung der Aptamerfunktionalität nach Immobilisierung. Der Chip wurde in zwei Bereiche aufgeteilt, wobei in jedem Bereich entweder 12,5  $\mu\text{M}$  VDBA14 oder 6,25  $\mu\text{M}$  VDBA14 in 3x SSC-Puffer immobilisiert wurde. Dabei stellen die verschiedenen Blöcke (dunkelgrau) voneinander getrennte Reaktionskammern dar, in welchen verschiedene 25(OH)D-Konzentrationen getestet wurden.

Für die Überprüfung der Aptamerfunktionalität nach der Immobilisierung wurde erneut ein Microarray-Experiment durchgeführt. In Kapitel 4.3.3 wurde die Aptamersättigungskonzentration mit 12,5  $\mu\text{M}$  bestimmt, sodass dies als höchste Konzentration in diesem Experiment verwendet wurde. Weiterhin wurde eine niedrige Aptamerkonzentration von 6,25  $\mu\text{M}$  verwendet, um gegebenenfalls einen Einfluss der VDBA14-Immobilisierungskonzentration auf die Aptamerfunktionalität beobachten zu können. Das Microarraylayout des Experimentes ist in Abb. 4.17 gezeigt. Je Aptamerkonzentration (12,5  $\mu\text{M}$  und 6,25  $\mu\text{M}$ ) wurden sechs Blöcke des Microarray-Chips genutzt. Die verschiedenen Blöcke sind voneinander getrennte Reaktionskammer, sodass eine 25(OH)D-Verdünnungsreihe realisiert werden konnte. 25(OH)D wurde seriell verdünnt und dann mit 100 nM des 5'-Cy5-markierten Oligonukleotids (finale Konzentration) vermischt. Daraus ergab sich eine finale 25(OH)D-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  25(OH)D bis 0,62  $\mu\text{M}$  reichend. 150  $\mu\text{L}$  des 25(OH)D-Oligonukleotid-Gemisches wurde dann in die verschiedenen Blöcke transferiert. Durch die gleichzeitige Zugabe der beiden VDBA14-Interaktionspartner handelt es sich somit um einen kompetitiven TID-Modus, da beide Bindungspartner gleichzeitig um die VDBA14-Bindungsplätze konkurrieren. Ist das Aptamer nach der Immobilisierung noch funktionsfähig, resultiert daraus eine Verdrängung des komplementären, 5'-Cy5-markierten Oligonukleotids. Liegt das Aptamer jedoch denaturiert oder fehlgefaltet vor, wird die Bildung des Aptamer-Oligonukleotid-Komplexes bevorzugt und es kann keine Verdrängung beobachtet werden. Somit wurde erwartet, dass die Fluoreszenzintensität mit steigender 25(OH)D-Kon-

zentration abnimmt, da das fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid durch das Target verdrängt wird, falls es nach Immobilisierung noch funktionsfähig ist. Falls das Aptamer durch die Immobilisierung nicht mehr funktionsfähig ist, sollte keine Verdrängung beobachtet werden.



(a) Verdrängung von 100 nM 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotid 2 durch 25(OH)D bei einer VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 6,25 µM.

(b) Verdrängung von 100 nM 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotid 2 durch 25(OH)D bei einer VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 12,5 µM.

**Abb. 4.18.:** (a) Einfluss der 25(OH)D-Konzentration auf die Verdrängung von 100 nM des komplementären Oligonukleotids 2 bei einer VDBA14-Immobilisierungsdichte von 6,25 µM VDBA14 (b) Einfluss der 25(OH)D-Konzentration auf die Verdrängung von 100 nM des komplementären Oligonukleotids 2 bei einer VDBA14-Immobilisierungsdichte von 12,5 µM. Die 25(OH)D-Verdünnung erfolgte in Aptamerbindepuffer mit 10 % (v/v) Ethanol. Die jeweilige 25(OH)D-Konzentration wurde anschließend mit 100 nM dem 5'-Cy5-markierten Oligonukleotid 2 (finale Konzentration) vermischt. So wurde eine finale 25(OH)D-Konzentration von 10 µM bis 0,62 µM reichend eingestellt. 150 µL des 25(OH)D-O2-Gemisches wurde anschließend in die verschiedenen Blöcke transferiert. Nach einer Inkubation von 1 h wurde der Chip gewaschen und getrocknet. Die Fluoreszenzintensität wurde anschließend mit GenePix-Scanner und GenePix-Software bestimmt und in Origin 2018 ausgewertet. Das Microarrayexperiment wurde drei mal wiederholt ( $N = 3$ ) und aus der Standardabweichung der Fluoreszenzintensitäten die Fehlerbalken berechnet. Die finale Bearbeitung erfolgte in Origin 2018.

Abb. 4.18 zeigt das Ergebnis des Microarray-Experimentes. Sowohl bei der niedrigen VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 6,25 µM, als auch bei der vorher bestimmten Sättigungskonzentration von 12,5 µM lässt sich eine 25(OH)D-abhängige Verdrängung des Oligonukleotids beobachten. Dies äußert sich in einer sinkenden Fluoreszenzintensität, je höher die 25(OH)D-Konzentration ist. Bereits eine Erhöhung der 25(OH)D-Konzentration von 0 µM auf 1 µM führt zu einer sichtbaren Absenkung der Fluoreszenzintensität. Bei beiden VDBA14-Immobilisierungskonzentrationen ist die geringste Signalintensität bei 10 µM 25(OH)D

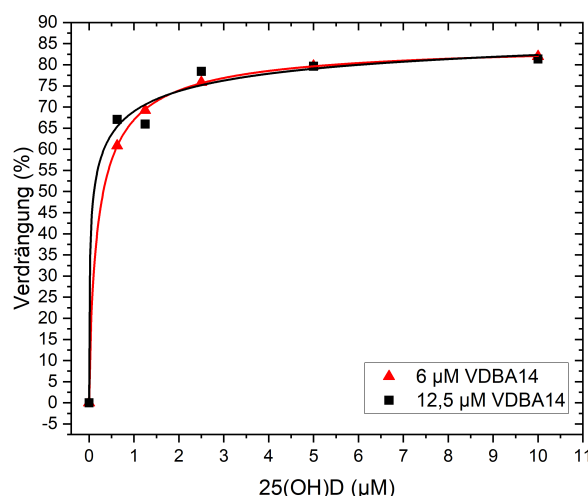
zu beobachten. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Signalintensität bei der Verwendung von 12,5  $\mu\text{M}$  VDBA14 generell höher ist. Durch eine höhere Aptamerkonzentration auf der Oberfläche können auch mehr 5'-Cy5-markierte Oligonukleotide binden, was sich in einem erhöhten Fluoreszenzsignal zeigt. Ein negativer Einfluss der höheren Aptamerkonzentration während der Immobilisierung (am Sättigungspunkt von 12,5  $\mu\text{M}$ ) auf die TID-Funktionalität konnte in diesem Experiment nicht beobachtet werden.

Für die Vergleichbarkeit von verschiedenen Microarrayexperimenten wurde anschließend die prozentuale Oligonukleotidverdrängung berechnet. Als Referenzpunkt der Berechnung wird die Signalintensität (RFU) des Oligonukleotids bei 0  $\mu\text{M}$  25(OH)D verwendet (siehe Formel 4.1).

$$\text{Verdrängung (\%)} = 100\% - \left( \frac{RFU_c}{RFU(0 \mu\text{M } 25(\text{OH})D)} \right) 100\% \quad (4.1)$$

Die Verdrängung wurde anschließend erneut gegen die 25(OH)D-Konzentration aufgetragen (Abb. 4.19).

Mit steigender 25(OH)D-Konzentration nimmt die Verdrängung zu, wobei die maximale Verdrängung ab einer 25(OH)D-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  erreicht ist. Weiterhin ist zu erkennen, dass sich die Kurvenverläufe der beiden getesteten VDBA14-Immobilisierungskonzentrationen ähneln. Bei der Verwendung von 12,5  $\mu\text{M}$  VDBA14 kann ein leicht steilerer Anstieg der Verdrängung im Bereich von 0  $\mu\text{M}$  bis 1  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Beide VDBA14-Immobilisierungskonzentrationen führen zu einer maximalen Oligonukleotidverdrängung von bis zu 85 %. Anhand der maximalen Verdrängung bei beiden VDBA14-Immobilisierungskonzentrationen wurden anschließend der  $K_{25}$  und  $K_{75}$ -Wert berechnet. Der  $K_{25}$ -Wert ist die 25(OH)D-Konzentration, bei der 25 % der maximalen Verdrängung erreicht werden. Der  $K_{75}$ -Wert gibt die 25(OH)D-Konzentration an, bei der 75 % der maximalen Verdrängung erreicht werden. Je geringer der  $K_{25}$ -Wert, desto sensibler ist die Methode. Je größer der  $K_{75}$ -Wert, desto breiter ist der Detektionsbereich von 25(OH)D mit der verwendeten Methode. Der  $K_{75}$ -Wert entspricht der  $K_d$ . Durch die Berechnung der K-Werte ist es möglich, den möglichen Einfluss der VDBA14-Immobilisierungskonzentration auf die Aptamerfunktionalität noch genauer zu untersuchen. Die errechneten K-Werte für beide VDBA14-Immobilisierungskonzentrationen sind in Tabelle 4.4 gezeigt. Bei beiden VDBA14-Konzentrationen zeigt sich eine maximale Verdrängung von ca. 85 %. Die Verwendung einer Immobilisierungskonzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  VDBA14 führt zu einem 14-fach niedrigeren  $K_{25}$ -Wert. Das deutet darauf hin, dass der TID-Assay bei der Verwendung von 12,5  $\mu\text{M}$  VDBA14 während der Immobilisierung wesentlich sensibler ist, als bei



**Abb. 4.19.:** 25(OH)D-abhängige Verdrängung von 100 nM 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotids 2. 6  $\mu\text{M}$  und 12,5  $\mu\text{M}$  VDBA14 wurden zuvor auf einem 3D-Microarraychip in 3x SSC als sechsfach Replikate immobilisiert. Die 25(OH)D-Verdünnung erfolgte in Aptamerbindepuffer mit 10 % (v/v) Ethanol. Die jeweilige 25(OH)D-Konzentration wurde anschließend mit 100 nM des 5'-Cy5-markierten Oligonukleotids 2 (finale Konzentration) vermischt. So wurde eine finale 25(OH)D-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  bis 0,62  $\mu\text{M}$  reichend eingestellt. Die finale Oligonukleotidkonzentration betrug 100 nM. 150  $\mu\text{L}$  des 25(OH)D-Oligonukleotid-Gemisches wurde anschließend in die verschiedenen Blöcke transferiert. Nach einer Inkubation von 1 h wurde der Chip gewaschen und getrocknet. Die Fluoreszenzintensität wurde anschließend mit GenePix-Scanner und GenePix-Software bestimmt. Aus den erhaltenen Fluoreszenzintensitäten wurde dann mit Formel 4.1 die hier gezeigte Verdrängung berechnet. Die finale Bearbeitung erfolgte in Origin 2018.

der Verwendung von 6,25  $\mu\text{M}$  VDBA14. Der mögliche Detektionsbereich von 25(OH)D lässt sich mit dem  $K_{75}$ -Wert abschätzen. Dieser ist bei beiden VDBA14-Konzentrationen ähnlich hoch und sorgt dadurch für einen breiten Responsebereich des TID-Assays. Die  $K_d$  ist bei der VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  wesentlich niedriger, als bei 6,25  $\mu\text{M}$  (0,06 nM). Verglichen mit der in der MST ermittelten  $K_d$  von ca. 10 nM führt die Immobilisierung des Aptamers im Microarrayformat zu einer erhöhten TID-Sensitivität.

In diesem Kapitel wurde der Einfluss der VDBA14-Immobilisierungskonzentration von VDBA14 auf die Aptamerfunktionalität überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass eine Durchführung des TID-Assays bei der Aptamersättigungskonzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  zu keiner Beeinträchtigung der 25(OH)D-Bindung führt und somit die Oligonukleotidverdrängung auch nicht eingeschränkt wird. Die Verwendung der in Kapitel 4.3.3 bestimmten Aptamersättigungskonzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  während der Immobilisierung führte zu einem leicht sensitiveren TID-Assay,



**Tab. 4.4.:** Einfluss der VDBA14-Immobilisierungskonzentration auf die Sensitivität der 25(OH)D-Detektion mittels TID-Assay.

VDBA14-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	Max. Verdrängung (%)	$K_{25}$ (nM)	$K_{50}$ (nM)	$K_{75}$ (nM)
6,25	85,54	54,84	0,21	800,2
12,5	85,51	3,68	0,06	539,27

als die Verwendung von 6,25  $\mu\text{M}$  VDBA14. Für die weitere Optimierung des neuentwickelten TID-Assays hinsichtlich einer maximierten Verdrängung der Oligonukleotide wurde im Folgenden der Einfluss von Spacern bei der Immobilisierung untersucht. Weiterhin wurde Oligonukleotid 2 mit Oligonukleotid 3 hinsichtlich der Verdrängungseffizienz verglichen und die Reihenfolge der Inkubation während des TID-Assays untersucht. Anschließend werden zusammenfassend die bisherigen Optimierungen zusammengefasst und der TID-Assay kann abschließend charakterisiert werden.

## 4.4. Entwicklung eines kompetitiven TID-Assays

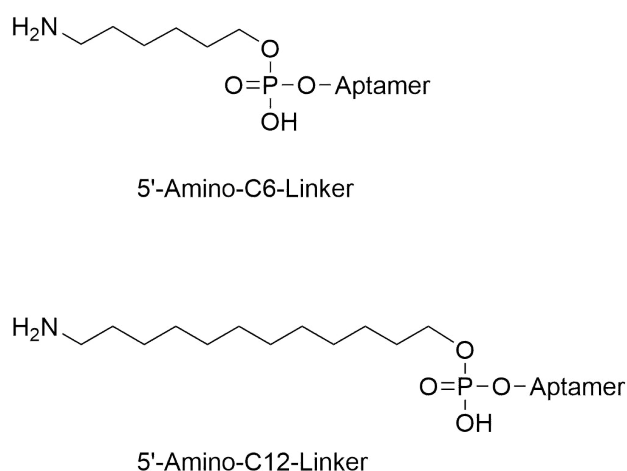
Für die Verwendung von VDBA14 in einem TID-Assay wurden in den vorherigen Kapiteln komplementäre Oligonukleotide erstellt, erstmals in TID-Experimenten erprobt (4.2) und der Einfluss der Immobilisierung von VDBA14 auf seine Funktionalität überprüft (4.3). Sowohl Oligonukleotid 2, als auch Oligonukleotid 3 werden konzentrationsabhängig durch 25(OH)D verdrängt. Weiterhin wurde gezeigt, dass die VDBA14-Immobilisierung keinen negativen Einfluss auf die Immobilisierung und Verdrängung der komplementären Oligonukleotide hat. Um den Einfluss weiterer Parameter, wie beispielsweise den Einfluss des verwendeten Oligonukleotids auf die Verdrängungseffizienz zu untersuchen, wird der TID-Assay in diesem Kapitel weiter optimiert.

Neben der VDBA14-Immobilisierungskonzentration hat auch, der für die Immobilisierung verwendete, Linker einen Einfluss auf die Aptamerfunktionalität. Langkettige Spacer im Linker können die Aptamerfaltung bei der Immobilisierung stabilisieren und so zu verbesserten Bindungseigenschaften führen. Daher wurde im folgenden Kapitel der Einfluss von verschiedenen Linkerlängen auf die Aptamerfunktionalität überprüft.

### 4.4.1. Verwendung von Spacern

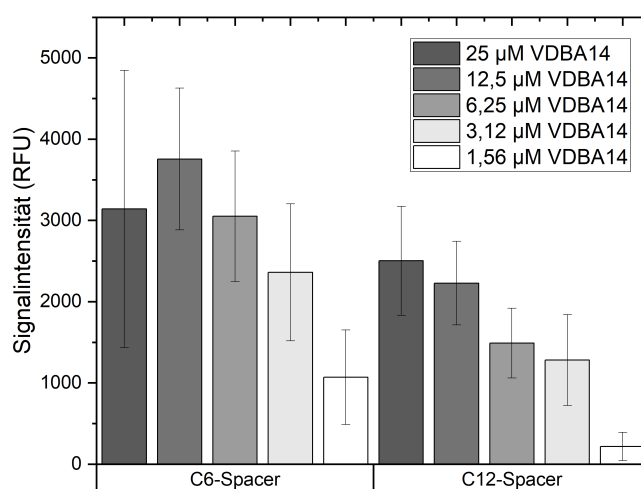
Für die Aptamerimmobilisierung auf funktionalisierten Oberflächen wird eine Modifizierung des Aptamers benötigt, um eine kovalente Bindung zwischen Aptamer und Oberfläche auszu-

bilden. Hierfür werden Linker verwendet. Die Verwendung von Abstandshaltern (Spacer) zwischen Aminogruppe und 3'-Ende des Aptamers kann zu dem Erhalt der korrekten Aptamerfaltung bei Immobilisierung beitragen. Durch eine Erhöhung der Distanz zwischen Aptamer und Immobilisierungsoberfläche können so elektrostatische Wechselwirkungen minimiert werden. Häufig werden Alkyl-, Polythymine- und Polyethylenglykol-basierte (PEG) Spacer verwendet [96]. Es wird die Verwendung von langkettigen Alkylspacern empfohlen, da diese kaum mit der Aptamerstruktur wechselwirken. Häufig verwendete Alkylspacer sind C6- und C12-Spacer (siehe Abb. 4.20), wobei die Annotation Auskunft über die Länge der Alkylkette gibt.



**Abb. 4.20.:** Strukturformeln der verwendeten Aptamer-Linker für die Immobilisierung im Microarrayformat. Für die Immobilisierung von Aptameren auf einer aldehydmodifizierten Oberfläche muss das Aptamer über eine  $\text{NH}_2$ -Funktionalisierung verfügen. Dafür werden Linker verwendet, welche weiterhin zwischen Aptamer und Aminogruppe über einen Spacer verfügen. Die in dieser Arbeit verwendeten Spacer bestehen aus einer Alkylkette, wobei die Anzahl der Kohlenstoffatome namensgebend für den Linker ist.

Der Effekt der Verwendung von Spacern auf die Aptamerfunktionalität und Immobilisierungseffizienz lässt sich nicht im Voraus abschätzen und ist von dem verwendeten Aptamer abhängig. So muss der Einfluss von Spacern für jedes Aptamer empirisch bestimmt werden [97]. Langkettige Spacer können nicht nur einen positiven Einfluss bei der Immobilisierung besitzen. Durch unerwünschte Aptamer-Spacer-Interaktionen können Fehlfaltungen im Aptamer ausgelöst werden. Um den Einfluss der Kettenlänge von Alkylspacern auf die Immobilisierungseffizienz von VDBA14 zu überprüfen, wurde erneut ein Microarrayexperiment durchgeführt. Es wurden fünf Aptamerkonzentrationen in 3x SSC auf einer 3D-Aldehydoberfläche immobilisiert ( $25\text{ }\mu\text{M}$  bis  $1,56\text{ }\mu\text{M}$ ). Dabei wurden C6-Aptamer-Spacer und C12-Aptamer-Spacer bei der Immobilisierung verwendet. Die Anfärbung des immobilisierten VDBA14 erfolgte mittels SYBR<sup>®</sup> Green I/II in PBS-Puffer (Abb. 4.21).

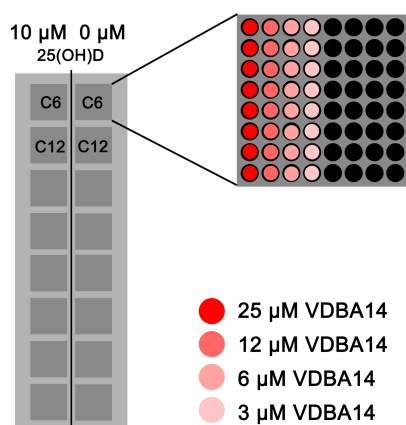


**Abb. 4.21.:** Einfluss der Spacerlänge auf die Immobilisierungseffizienz im Microarrayformat. Fünf VDBA14-Konzentrationen wurden sowohl mit C6-Spacer, als auch mit C12-Spacer kovalent auf der 3D-Microarrayoberfläche in 3x SSC immobilisiert (C.3.1). Anschließend erfolgte eine Anfärbung der Aptamere mit einer SYBR<sup>®</sup> Green I/II-Lösung in PBS-Puffer für 15 min. Nach Ablauf der Zeit wurde der gesamte Chip gewaschen, getrocknet und die Fluoreszenzintensität mittels GenePix-Scanner und GenePix-Software ausgewertet. Die erhaltene Signalintensität wurde anschließend gegen die VDBA14-Konzentration aufgetragen. Die Immobilisierung wurde dreimal wiederholt ( $N = 3$ ) und aus der Standardabweichung der Signalintensitäten wurden die Fehlerbalken berechnet. Die Signalintensität ist proportional zur Immobilisierungseffizienz. Die finale Bearbeitung erfolgte in Origin 2018.

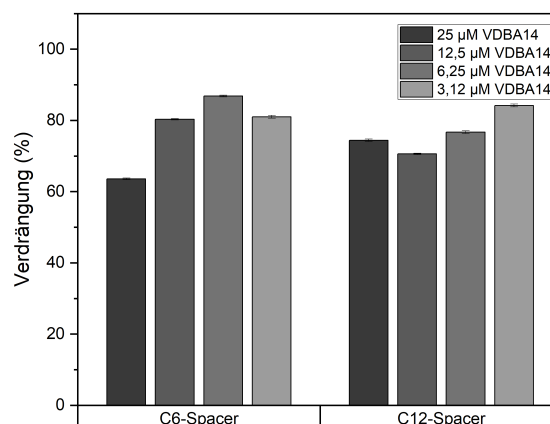
Mit steigender VDBA14-Konzentration kann eine Steigerung der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Die maximale Signalintensität ist bei der Verwendung des C12-Spacers bei einer Aptamerkonzentration von 25 µM erreicht. Bei der Verwendung des C6-Spacers liegt die Signalintensität bei 12,5 µM Aptamer höher, als bei 25 µM. Insgesamt sind die gemessenen Signalintensitäten bei der Verwendung des C6-Spacers höher, als bei der Verwendung des C12-Spacers. Ähnliche Effekte der Spacer-Länge auf die Immobilisierungseffizienz wurden bereits in der Literatur beschrieben [98]. So kann es durch Fehlfaltungen des Aptamers, welche durch langkettige Spacer hervorgerufen werden, zu verminderten Immobilisierungseffizienzen kommen. Weiterhin können Fehlfaltungen die Immobilisierung gänzlich verhindern, da die Aminofunktion des Aptamers nicht mehr für die Reaktion mit der Aldehydgruppe der Microarrayoberfläche zur Verfügung steht. Daraus resultiert eine verminderte Signalintensität, da bei der Immobilisierung ein großer Anteil an Aptameren keine kovalente Bindung mit der Oberfläche des Microarrays ausbildet. Die Spacerlänge wirkt sich nicht nur auf die Immobilisierung

aus, sondern kann auch die Verdrängung der komplementären Oligonukleotide im TID-Assay beeinflussen. So könnten lange Spacer für eine bessere Zugänglichkeit der Targetbindestelle sorgen. Dies würde sich in einer gesteigerten Oligonukleotidverdrängung zeigen. Es ist jedoch ebenfalls möglich, dass länger-kettige Spacer die oben genannten Fehlfaltungen hervorrufen. Das Gleichgewicht der kompetitiven TID-Reaktion würde dann auf Seiten des VDBA14-Oligonukleotid-Komplexes liegen, da das Aptamer durch die fehlerhafte dreidimensionale Faltung nicht mehr in der Lage wäre, 25(OH)D zu binden. Der Einfluss der Spacerlänge auf die Oligonukleotidverdrängung wurde erneut in einem Microarrayexperiment untersucht. Dafür wurden vier Aptamerkonzentrationen (25  $\mu$ M, 12  $\mu$ M, 6  $\mu$ M, 3  $\mu$ M) in 3x SSC-Puffer gelöst und auf der 3D-Chipoberfläche immobilisiert (sowohl für den C6- als auch für den C12-Spacer). Anschließend wurde als Positivkontrolle 10  $\mu$ M 25(OH)D in eine Reaktionskammern gegeben, wohingegen in eine andere Kammer kein 25(OH)D gegeben wurde (Abb. 4.22a). Das 5'-Cy5-markierte Oligonukleotid 2 wurde mit dem Target 25(OH)D gleichzeitig in beide Kammern mit einer finalen Konzentration von 100 nM gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde der Überstand der Kammern abgenommen und der Chip wurde mehrfach gewaschen. Nach Trocknung wurde die Fluoreszenzintensität der gebundenen Oligonukleotide mittels GenePix-Scanner gemessen. Aus den erhaltenen Fluoreszenzintensitäten wurde dann die Verdrängung (%) mit Formel 4.1 berechnet und gegen die VDBA14-Immobilisierungskonzentration aufgetragen (Abb. 4.22b).

Die Verdrängung liegt bei allen Ansätzen zwischen 60 % und 90 %, was einer nahezu vollständigen Verdrängung des komplementären Oligonukleotids 2 entspricht. Dabei liefern beide Spacerlängen ähnlich hohe Verdrängungen, wobei der C6-Spacer bei mittleren VDBA14-Konzentrationen zu etwas höheren Verdrängungen führt. Sowohl in diesem Kapitel, als auch in Kapitel 4.3.4 konnte beobachtet werden, dass die Immobilisierung von 6,25  $\mu$ M und 12,5  $\mu$ M VDBA14 zu hohen Verdrängungen des komplementären Oligonukleotids 2 (bis zu 90 %) bei der Zugabe von 25(OH)D führt. Weiterhin konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass für diese VDBA14-Konzentrationen die Verwendung des C6-Spacers bei der Immobilisierung zu einer effizienteren VDBA14-Immobilisierung führt, was sich in erhöhten Fluoreszenzintensitäten beobachten ließ. In TID-Versuchen im Microarrayformat ähnelten sich die prozentualen Verdrängungen des Oligonukleotids bei beiden Spacerlängen, sodass keiner der Beiden dem Anderen überlegen war. Für die weiteren Microarrayexperimente wurde der C6-Spacer verwendet, da dieser zu einer besseren Immobilisierungseffizienz führt, als die Verwendung des C12-Spacers.



(a) Experimentelles Layout des Microarraychips für den Spacervergleich.



(b) Einfluss der Spacerlänge auf die Oligonukleotidverdrängung.

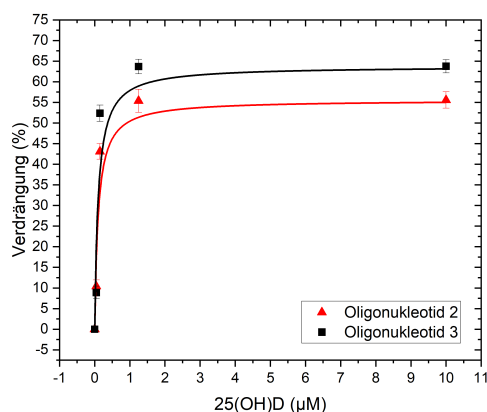
**Abb. 4.22.:** (a) Für den Vergleich der Spacerlängen wurden vier VDBA14-Konzentrationen als 8-fach Replikate je Block immobilisiert (rote Farbabstufungen). Dabei wurde in zwei Blöcken VDBA14 mit C6-Spacer und in zwei weiteren Blöcken VDBA14 mit C12-Spacer in 3x SSC-Puffer immobilisiert. (b) Einfluss der Spacerlänge auf die Verdrängung von 100 nM 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotid 2. Für die kompetitive TID-Reaktion wurde 10 µM 25(OH)D (finale Konzentration) als Positivkontrolle mit 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotid 2 (finale Konzentration von 100 nM) vermischt. Als Negativkontrolle diente lediglich 100 nM 5'-Cy5-markiertes Oligonukleotid und 0 µM 25(OH)D. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde der Chip gewaschen, getrocknet und anschließend die Fluoreszenzintensität mittels GenePix-Scanner und GenePix-Software bestimmt. Anschließend wurde aus den Fluoreszenzintensitäten der Positiv- und Negativkontrollen die Verdrängung mit Formel 4.1 berechnet. Die finale Bearbeitung erfolgte in Origin 2018.

#### 4.4.2. Einfluss des Oligonukleotids auf die Verdrängungseffektivität

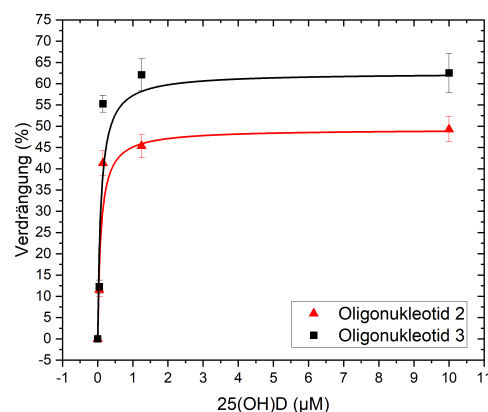
Für die Sensitivität eines TID-Assays ist das verwendete, komplementäre Oligonukleotid von entscheidender Bedeutung. Das Oligonukleotid ist allein für die Generierung eines messbaren Signals verantwortlich und sollte sich durch eine hohe Verdrängbarkeit durch das Target auszeichnen. In Kapitel 4.3.3 wurde unter Verwendung des komplementären Oligonukleotids 2 eine Verdrängung von bis zu 80 % erreicht. Für die Anwendung des TID-Assays im POCT-Bereich ist es wichtig, dass bereits geringe Targetkonzentrationen zu einer Verdrängung des komplementären Oligonukleotids führen. Dies resultiert idealerweise in niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Messmethode, was für einen sensitiven, diagnostischen Assay von hoher Wichtigkeit ist. Ausgehend von den MST-Experimenten in Kapitel 4.2.2 wurde Oligonukleotid 2 für die ersten Experimente im Microarrayformat verwendet. Oligonukleotid 2 zeigte in MST-Experimenten einen breiten Responsebereich auf 25(OH)D. Oligonukleotid 3 zeigte

einen schmalen Responsebereich, jedoch reagierte es sensitiver auf Konzentrationsänderungen von 25(OH)D im niedrigen nanomolaren Bereich (4.2.2). Um zu bestätigen, dass bei einer Immobilisierung von VDBA14 die Verwendung von Oligonukleotid 2 ebenfalls der Verwendung von Oligonukleotid 3 überlegen ist, wurde ein Microarrayexperiment durchgeführt. Dafür wurde 12,5  $\mu\text{M}$  und 6,25  $\mu\text{M}$  VDBA14 in 3x SSC auf einer 3D-Microarrayoberfläche immobilisiert, da sich für diese VDBA14-Immobilisierungskonzentrationen die höchsten Oligonukleotidverdrängungen in den Kapiteln 4.3.3 und 4.3.4 beobachten ließen. Die 25(OH)D-Konzentration wurde pro Reaktionskammer zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 8 nM variiert, um einen möglichst breiten Konzentrationsbereich von 25(OH)D abzudecken. 100 nM des jeweiligen 5'-Cy5-markierten Oligonukleotids wurden anschließend mit der 25(OH)D-Verdünnung vermischt. 150  $\mu\text{L}$  des Oligo-25(OH)D-Gemisches wurden anschließend in die Reaktionskammern gegeben, wodurch es sich um einen kompetitiven TID-Assay handelte. Für jeden Schritt des Experimentes wurde der Aptamerbindepuffer mit 10 % Ethanol verwendet. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 1 h wurde der Überstand aus den Kammern entfernt und der Chip wurde mehrfach gewaschen. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem GenePix-Scanner gemessen. Anschließend wurde die Verdrängung des Oligonukleotids (%) mit Gleichung 4.1 berechnet. Für den Vergleich von Oligonukleotid 2 und 3 im kompetitiven TID-Assay siehe Abb. 4.23.

Sowohl bei der Verwendung von Oligonukleotid 2, als auch Oligonukleotid 3 kann bei steigender 25(OH)D-Konzentration eine Zunahme der Verdrängung beobachtet werden. Die Verwendung des 5'-Cy5-markierten Oligonukleotids 3 im kompetitiven TID-Assay führt bei beiden getesteten VDBA14-Immobilisierungskonzentrationen zu einer höheren Verdrängung. Bei einer VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 6,25  $\mu\text{M}$  wird bei der Verwendung von Oligonukleotid 3 eine Verdrängung von bis zu 65 % erreicht (Abb. 4.23a). Bei einer VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  beträgt der selbe Wert 63 %. Da für die spätere Anwendung die Sensitivität des TID-Assays im niedrigen, nanomolaren Konzentrationsbereich ausschlaggebend ist, wurden die  $K_{25}$ -,  $K_{50}$ - und  $K_{75}$ -Werte für die Beurteilung der Oligonukleotide herangezogen. Der  $K_{25}$ -Wert ist die 25(OH)D-Konzentration, bei der 25 % der maximalen Verdrängung erreicht werden. Je größer der  $K_{25}$ -Wert, desto sensitiver ist die Methode für die Bestimmung von 25(OH)D. Der  $K_{50}$ -Wert ist die 25(OH)D-Konzentration, bei der 50 % der maximalen Verdrängung erreicht werden, er entspricht somit der  $K_d$ . Je kleiner die  $K_d$ , desto höher ist die Affinität des Aptamers. Der  $K_{75}$ -Wert gibt die 25(OH)D-Konzentration an, bei dem 75 % der maximalen Verdrängung erreicht werden. Je größer der  $K_{75}$ -Wert, desto breiter ist der 25(OH)D-Konzentrationsbereich in dem der TID-Assay das Target detektieren kann. Die K-Werte wurden anhand der maximalen Verdrängung nach einem Kurvenfitting (OriginLab Origin Pro 2018, Hill Fitting) berechnet und sind in Tab. 4.5 und Tab. 4.6 gezeigt.



**(a)** Verdrängung von 100 nM 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotid 2 und 3 durch 25(OH)D bei einer VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 6,25 μM.



**(b)** Verdrängung von 100 nM 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotid 2 und 3 durch 25(OH)D bei einer VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 12,5 μM.

**Abb. 4.23.:** Einfluss des verwendeten Oligonukleotids auf die Verdrängungseffizienz im TID-Assay für die Detektion von 25(OH)D. **(a)** Verdrängung von 100 nM der komplementären, 5'-Cy5-markierten Oligonukleotide bei verschiedenen 25(OH)D-Konzentrationen und einer VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 6,25 μM. **(b)** Verdrängung von 100 nM der komplementären, 5'-Cy5-markierten Oligonukleotide bei verschiedenen 25(OH)D-Konzentrationen und einer VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 12,5 μM. Für die kompetitive TID-Reaktion wurde 25(OH)D in Aptamerpuffer mit 10 % (v/v) Ethanol seriell verdünnt und anschließend gleichzeitig mit dem 5'-Cy5-markierten Oligonukleotid (finale Konzentration 100 nM) in die Reaktionskammern gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde der Chip gewaschen, getrocknet und anschließend die Fluoreszenzintensität mittels GenePix-Scanner und GenePix-Software bestimmt. Anschließend wurde aus den Fluoreszenzintensitäten die Verdrängung (%) mit Formel 4.1 berechnet. Die finale Bearbeitung erfolgte in Origin 2018.

Bei einer VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 6 μM (Tab. 4.5) führt die Verwendung von Oligonukleotid 3 zu einer höheren maximalen Verdrängung, als die Verwendung von Oligonukleotid 2. Die  $K_{25}$ -Werte der beiden Oligonukleotide bei dieser VDBA-Immobilisierungskonzentration zeigen vergleichbare Werte, wobei die Sensitivität des TID-Assays bei der Verwendung von Oligonukleotid 2 etwas höher war. Der  $K_{75}$ -Wert bei der Verwendung von Oligonukleotid 2 lag 50 % höher, als bei der Verwendung von Oligonukleotid 3. Ein hoher  $K_{75}$ -Wert spricht für einen breiteren 25(OH)D-Konzentrationsbereich, in dem der TID-Assay in der Lage ist, das Molekül nachzuweisen. Die  $K_d$  liegt bei der Verwendung von beiden Oligonukleotiden im niedrigen, nanomolaren Bereich (0,1 nM).

**Tab. 4.5.:** Einfluss von Oligonukleotid 2 und 3 auf die Verdrängungseffektivität im TID-Assay. Es wurde eine VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 6,25  $\mu\text{M}$  verwendet.

Oligonukleotid	Max. Verdrängung (%)	$K_{25}$ (nM)	$K_{50}$ (nM)	$K_{75}$ (nM)
2	57,24	8,50	0,11	142,79
3	64,75	10,70	0,10	106,23

**Tab. 4.6.:** Einfluss von Oligonukleotid 2 und 3 auf die Verdrängungseffektivität im TID-Assay. Es wurde eine VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  verwendet.

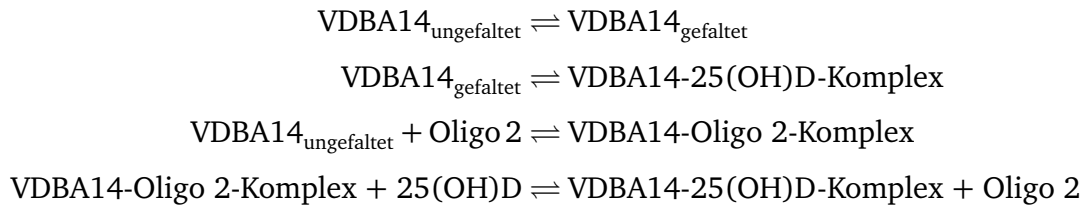
Oligonukleotid	Max. Verdrängung (%)	$K_{25}$ (nM)	$K_{50}$ (nM)	$K_{75}$ (nM)
2	48,36	5,24	0,09	75,62
3	62,95	6,76	0,09	63,69

Bei einer VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 12  $\mu\text{M}$  (Tab. 4.6) zeigten sich ähnliche  $K_{25}$ -Werte bei beiden Oligonukleotiden im kompetitiven TID-Assay. Auch bei dieser VDBA14-Konzentration führte die Verwendung von Oligonukleotid 2 zu einem niedrigeren  $K_{25}$ -Wert, was einer höheren Sensitivität bei der 25(OH)D-Detektion entspricht. Der  $K_{75}$ -Wert bei der Verwendung von Oligonukleotid 2 war ebenfalls höher, als bei der Verwendung von Oligonukleotid 3. Dies resultiert in einem breiteren Detektionsbereich von 25(OH)D bei der Verwendung von Oligonukleotid 2 im TID-Assay bei dieser VDBA14-Immobilisierungskonzentration. Die  $K_d$  liegt bei der Verwendung von beiden Oligonukleotiden im niedrigen, nanomolaren Bereich (0,09 nM). Bei beiden VDBA14-Immobilisierungskonzentrationen konnte unter der Verwendung von Oligonukleotid 2 sowohl eine höhere Sensitivität ( $K_{25}$ -Wert), als auch ein breiteres 25(OH)D-Konzentrationspektrum ( $K_{75}$ -Wert) abgedeckt werden. Erneut zeigte sich eine VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  als optimal, da bei dieser Konzentration der geringste  $K_{25}$ -Wert von 5,24 nM erreicht werden konnte. Somit wurde für die weiteren experimentellen Arbeiten weiterhin Oligonukleotid 2 verwendet, um weitere Optimierungen des TID-Assays durchzuführen.

#### 4.4.3. Inkubationsreihenfolge

In den vorherigen Kapiteln erfolgte die Zugabe von 25(OH)D und Oligonukleotid 2 gleichzeitig. Für die TID-Effizienz spielt jedoch die Reihenfolge der Komponentenzugabe eine entscheidende Rolle. Die drei Komponenten (VDBA14, 25(OH)D und O2) befinden sich bei gleichzeitiger Anwesenheit in Lösung in verschiedenen Gleichgewichtszuständen, die voneinander abhängig sind. Es muss demnach eine Reihe von Reaktionsgleichgewichten beachtet werden.





Zum Einen stellt sich in Lösung ein Gleichgewicht zwischen dem gefalteten und ungefalteten VDBA14 ein. Gefaltetes VDBA14 steht wiederum in einem Gleichgewichtszustand mit dem VDBA14-25(OH)D-Komplex. Bei Vorhandensein des ungefalteten VDBA14 stellt sich ein Gleichgewicht mit dem VDBA14-Oligo 2-Komplex ein. Dieser Komplex steht mit einem VDBA14-25(OH)D-Komplex im Gleichgewicht, wo das Oligonukleotid 2 ungebunden vorliegt. Dieses komplexe Geflecht aus Gleichgewichtszuständen muss bei der TID-Entwicklung beachtet werden, da sich aus der Inkubationsreihenfolge auch Unterschiede der Oligonukleotidverdrängung ergeben können. Basierend auf den gezeigten Reaktionen spielt die Reihenfolge der Zugabe von Aptamer, 25(OH)D und Oligonukleotid 2 eine wichtige Rolle. Es ergeben sich drei mögliche Ansätze der TID-Ausführung.

1. Gleichzeitige Zugabe von VDBA14, 25(OH)D und Oligo 2
2. Zugabe VDBA14 und 25(OH)D. Entfernen von ungebundenem 25(OH)D. Dann Zugabe Oligo 2
3. Zugabe VDBA14 und Oligo 2. Entfernen von ungebundenem Oligo 2. Dann Zugabe 25(OH)D

Ansatz 1, also die gleichzeitige Zugabe von 25(OH)D und Oligonukleotid 2, entspricht einem kompetitiven TID-Assay. In diesem Ansatz konkurrieren beide Bindungspartner um die freien VDBA14-Bindeplätze. In Ansatz 2 wird zuerst eine Aptamer-25(OH)D-Bindung ausgebildet, ungebundenes 25(OH)D durch Waschschrte entfernt und anschließend wird das komplementäre Oligonukleotid 2 hinzugegeben. In Ansatz 3 wird zuerst das Oligonukleotid 2 hinzugegeben, nach einer gewissen Inkubationszeit ungebundenes Oligonukleotid 2 entfernt und abschließend 25(OH)D hinzugegeben. Ansatz 2 entspricht einem Signal-On-Ansatz, da das fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid 2 das gebundene 25(OH)D verdrängt und anschließend mit VDBA14 hybridisiert. Daraus resultiert ein Anstieg der Fluoreszenzintensität. Ansatz 3 entspricht einem Signal-Off-Ansatz, da das fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid 2 durch 25(OH)D verdrängt wird. Dies resultiert in einer Verminderung der Fluoreszenzintensität.

**Tab. 4.7.:** Einfluss der Inkubationsreihenfolge auf die Verdrängung von Oligonukleotid 2. Ansatz 1 stellt einen kompetitiven Ansatz dar, bei dem 1  $\mu\text{M}$  25(OH)D und 100 nM Oligonukleotid 2 um die Aptamerbindestelle konkurrieren. Bei Ansatz 2 wird zuerst 1  $\mu\text{M}$  25(OH)D hinzugegeben. Nachdem sich nach 1 h eine Aptamer-25(OH)D-Bindung ausbildet, wurde der Überstand der Kammern abgenommen und der Chip gewaschen. Anschließend wurde 100 nM des Oligonukleotids 2 hinzugegeben, welches 25(OH)D verdrängt. Es folgte erneut eine Inkubation für 1 h. Ansatz 3 stellt das Gegenteil dar, bei dem zuerst das Oligonukleotid 2 mit einer finalen Konzentration von 100 nM hinzugegeben wurde. Nach einer einstündigen Inkubation wurde der Überstand abgenommen und der Chip gewaschen. Anschließend wurde 1  $\mu\text{M}$  25(OH)D hinzugegeben und der Ansatz für 1 h schüttelnd inkubiert. Mit Hilfe der Formel 4.1 wurde für alle fünf Aptamerkonzentrationen der Verdrängung in % berechnet.

	25 $\mu\text{M}$ Aptamer	12,5 $\mu\text{M}$ Aptamer	6 $\mu\text{M}$ Aptamer	3 $\mu\text{M}$ Aptamer	1,5 $\mu\text{M}$ Aptamer
Ansatz 1	57 %	62 %	63 %	47 %	48 %
Ansatz 2	24 %	26 %	21 %	18 %	17 %
Ansatz 3	34 %	33 %	31 %	20 %	13 %

Um den Einfluss der Inkubationsreihenfolge auf die Oligonukleotidverdrängung zu überprüfen, wurden drei separate Microarrayexperimente durchgeführt. Für jeden oben genannten Ansatz wurden fünf VDBA14-Konzentrationen in 3x SSC-Puffer auf einem 3D-Microarray immobilisiert. Als Positivkontrolle wurde 1  $\mu\text{M}$  25(OH)D verwendet, als Negativkontrolle eine Reaktionskammer mit 0  $\mu\text{M}$  25(OH)D. Es wurde das 5'-Cy5-markierte Oligonukleotid 2 mit einer finalen Konzentration von 100 nM eingesetzt. Das gesamte Microarrayexperiment wurde in Aptamerbindepuffer mit 10 % Ethanol durchgeführt. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 1 h wurde die jeweilige zweite Komponente hinzugefügt (Ansatz 2 und 3) und erneut 1 h inkubiert. Für Ansatz 1 erfolgte die kompetitive Reaktion über einen Zeitraum von 1 h. Nach Ablauf der Zeit wurden bei jedem Ansatz die Reaktionskammern des Microarraychips gewaschen und der ganze Chip getrocknet. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem GenePix-Scanner bestimmt. Mittels Formel 4.2 wurde dann die Verdrängung für jeden Ansatz berechnet. Die maximale Verdrängung pro Ansatz ist in Tab. 4.7 gezeigt.

Die höchsten Verdrängungen konnten durch den kompetitiven Ansatz 1 erzielt werden. Wie in Kapitel 4.4.2 und 4.4.1, wurden die höchsten Verdrängungen bei VDBA14-Immobilisierungskonzentrationen von 6,25  $\mu\text{M}$  und 12,5  $\mu\text{M}$  erreicht (maximale Verdrängung 63 %). Die niedrigsten Verdrängungen wurden bei Ansatz 2 beobachtet. Dieser Ansatz entsprach einer Verdrängung des 25(OH)D durch das Oligonukleotid 2. In diesem Ansatz führte einer VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  zu einer maximalen Oligonukleotidverdrängung von 26 %. Ansatz 3, der Signal-Off-Ansatz, lieferte nach Ansatz 1 die zweithöchsten Verdrän-

gungen. In diesem Ansatz konnte die maximale Verdrängung bei einer VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 25  $\mu\text{M}$  erreicht werden (34 %).

Nicht nur die Inkubationsreihenfolge spielt bei der Maximierung der Verdrängung eine Rolle. Auch die Inkubationsdauer des TID-Assays spielt für die spätere Anwendung im POCT-Rahmen eine wichtige Rolle. So kann unter der Verwendung des kompetitiven Ansatzes 1 eine Zeitreduktion des Assays um 1 h erzielt werden. Bei Ansatz 2 und 3 sind vor der eigentlichen Verdrängungsreaktion noch Inkubationszeiten inkludiert, welche für das Ausbilden des VDBA14-O2- oder VDBA14-25(OH)D-Komplexes nötig sind. Der kompetitive Ansatz 1 führte bei allen VDBA14-Immobilisierungskonzentrationen zu höheren Oligonukleotidverdrängungen, als die anderen beiden Ansätze. Die höchste Verdrängung konnte erneut bei einer VDBA14-Immobilisierungskonzentrationen von 6  $\mu\text{M}$  und 12,5  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Für die Detektion von 25(OH)D im TID-Assay wird somit ein kompetitiver Ansatz durchgeführt, da dieser zu der höchsten Verdrängung des komplementären Oligonukleotids führt. Weiterhin verkürzt sich durch diesen Ansatz die Assaydauer um bis zu 1 h.

#### 4.4.4. Optimierte Bedingungen des TID-Assays

In der vorliegenden Dissertation wurde ein TID-Assay für die Detektion des niedermolekularen Moleküls 25(OH)D entwickelt. Dieser TID-Assay kann später einfach auf Aptasensoren für die Detektion von 25(OH)D in der patientennahen Diagnostik (POCT) übertragen werden. Durch die Verwendung des Microarrayformates wurden eine Reihe von Optimierungen für eine verbesserte TID-Sensitivität durchgeführt, welche nachfolgend zusammengefasst werden.

Die optimale VDBA14-Konzentration bei der Immobilisierung wurde mit 12,5  $\mu\text{M}$  bestimmt (Kapitel 4.3.3). Weiterhin wurde gezeigt, dass der optimale Puffer für eine maximale Immobilisierungseffizienz 3x SSC-Puffer ist. Die Verwendung dieses Puffers während der Immobilisierung führte zu den höchsten Fluoreszenzintensitäten (Kapitel 4.3.3). Die Verwendung von C6-Spacern am 5'-Terminus von VDBA14 führte zu höheren Immobilisierungsausbeuten, als die Verwendung eines C12-Spacers (Kapitel 4.4.1). Der Vergleich von Oligonukleotid 2 und 3 mittels  $K_{25}$ ,  $K_{50}$  und  $K_{75}$ -Wert zeigte, dass die Verwendung von Oligonukleotid 2 zu einer höheren Sensitivität bei der 25(OH)D-Bestimmung führt, was sich in einem niedrigen  $K_{25}$ -Wert zeigte. Ebenfalls führte die Verwendung von Oligonukleotid 2 zu einem breiten 25(OH)D-Konzentrationsbereich, welcher mit dem TID-Assay vermessen werden kann (Kapitel 4.4.2). Sowohl in Kapitel 4.3.4 als auch Kapitel 4.4.2 führte eine VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  zu den höchsten Sensitivitäten und breitesten Detektionsbereichen (ermittelt mittels  $K_{25}$  und  $K_{75}$ -Wert). Abschließend wurde die Inkubationsreihenfolge hinsichtlich der ma-

ximalen Oligonukleotidverdrängung optimiert. Der kompetitive Ansatz erwies sich als zeitsparender und führte zu einer höheren Oligonukleotidverdrängung (Kapitel 4.4.3). Nachfolgend die optimierten Bedingungen für die Detektion von 25(OH)D im TID-Assay.

- 3D-Aldehydfunktionalisierung des Microarrays für VDBA14-Immobilisierung
- Verwendung VDBA14-C6-NH<sub>2</sub>-Linker für die Immobilisierung
- Immobilisierung von VDBA14 in 3x SSC-Puffer
- Immobilisierungskonzentration von 12,5 µM VDBA14
- Verwendung von 100 nM 5'-Cy5-gelabelten Oligonukleotid 2
- Zugabe 25(OH)D und Oligo 2 gleichzeitig für kompetitiven TID-Assay

Die oben genannten Bedingungen wurden für alle folgenden Charakterisierungen des TID-Assays verwendet.

## **4.5. Detektion von 25(OH)D im kompetitiven TID-Assay**

Ziel dieser Dissertation war die Entwicklung eines aptamerbasierten Detektionssystems für 25(OH)D. Dafür wurde ein TID-Assay entwickelt, welcher sich die Verdrängung von komplementären, markierten Oligonukleotiden zu Nutze macht. In den vorangegangenen Kapiteln wurden die allgemeinen Eigenschaften von VDBA14 untersucht. Weiterhin wurden komplementäre Oligonukleotide entworfen, charakterisiert und erfolgreich durch die Zugabe von 25(OH)D verdrängt. Die Immobilisierung von VDBA14 führte zu keiner Beeinträchtigung der Aptamerfunktionalität. Die erstellten komplementären Oligonukleotide wurden sowohl in Lösung mittels MST, als auch im immobilisierten Format mittels Microarray evaluiert und der TID-Assay charakterisiert. Abschließend werden in diesem Kapitel Sensitivität, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze des TID-Assays für die Detektion von 25(OH)D bestimmt.

### **4.5.1. Detektion von nanomolaren 25(OH)D-Konzentrationen im kompetitiven TID-Assay**

In den vorherigen Kapiteln wurde der TID-Assay im Microarrayformat untersucht und optimiert. Dabei wurden für die Untersuchung der Oligonukleotidverdrängung durch 25(OH)D

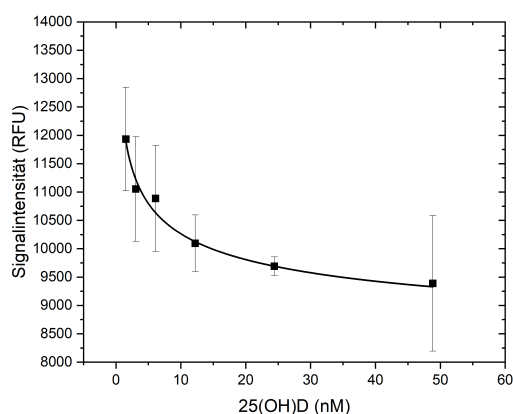
**Tab. 4.8.:** 25(OH)D-Serumkonzentrationen und daraus resultierende Krankheitsbilder, welche durch ungenügende Vitamin D-Versorgung auftreten können [99].

Definition	25(OH)D-Konzentration	Auswirkungen
Vitamin D-Mangel	< 25 nM	Rachitis, Osteomalazie, Frakturen
Vitamin D-Insuffizienz	25 - 49 nM	Knochenverlust, Frakturen
Ausreichende Versorgung	≥ 50 nM	Geringes Risiko für Knochenverlust

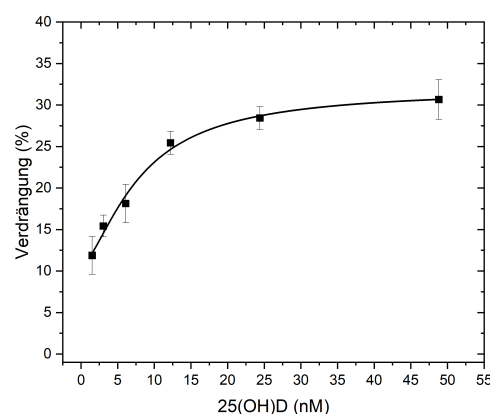
hohe Konzentrationen im mikromolaren Bereich verwendet (Kapitel 4.4.2). Da die Analytkonzentration (für die Bestimmung von Vitamin D-Mangel und Vitamin D-Insuffizienz) im niedrigen, nanomolaren Bereich von 25 nM bis 50 nM liegt, sollte der TID-Assay in diesem Bereich besonders sensitiv sein (Tab. 4.8).

Mit den optimierten TID-Assay-Bedingungen (siehe Kapitel 4.4.4) wurde ein Microarrayexperiment durchgeführt. 25(OH)D wurde im Bereich von 48 nM bis 1,5 nM seriell verdünnt, um reale 25(OH)D-Konzentrationen im menschlichen Körper abzubilden. Anschließend wurde die jeweilige 25(OH)D-Konzentration mit 100 nM Oligonukleotid 2 (finale Konzentration) vermischt und in die Reaktionskammern des Microarraychips gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde der Microarraychip gewaschen und anschließend die Fluoreszenzintensität mittels GenePix-Scanner bestimmt (Abb. 4.24a).

Mit steigender 25(OH)D-Konzentration lässt sich eine Abnahme der Signalintensität erkennen. Dies wurde erwartet, da höhere 25(OH)D-Konzentrationen zu einer erhöhten Verdrängung des fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids führen. Bereits geringe 25(OH)D-Konzentrationen von < 10 nM genügen, um das komplementäre Oligonukleotid zu verdrängen. Aus der Signalintensität wurde anschließend mit Formel 4.2 die Oligonukleotidverdrängung berechnet. Die Verdrängung wurde dann gegen die 25(OH)D-Konzentration aufgetragen (Abb. 4.24b). Mit zunehmender 25(OH)D-Konzentration kann eine erhöhte Oligonukleotidverdrängung beobachtet werden. Die maximale Verdrängung ist bei 48 nM 25(OH)D zu sehen, welche dort 30 % beträgt. Somit sind bei 48 nM 25(OH)D 30 % aller gebundenen Oligonukleotide verdrängt worden. Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass der neuentwickelte TID-Assay auch auf 25(OH)D-Konzentrationen im nanomolaren Bereich mit der Verdrängung der komplementären Oligonukleotide reagiert. Der lineare Bereich des TID-Assays konnte im Bereich von ca. 1,5 nM bis 12 nM identifiziert werden, was prinzipiell die diagnostische Detektion von 25(OH)D ermöglichen sollte. Ein weiteres, wichtiges Charakterisierungsmerkmal von Messmethoden ist das Signal-Zu-Rausch-Verhältnis (SNR). Dieser Wert gibt Auskunft über die Qualität des Messsignals. Bevor die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze



**(a)** Änderung der Fluoreszenzintensität von 100 nM 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotid 2 durch 25(OH)D im Bereich von 1,5 nM bis 48 nM.



**(b)** Verdrängung von 100 nM 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotid 2 durch 25(OH)D im Bereich von 1,5 nM bis 48 nM.

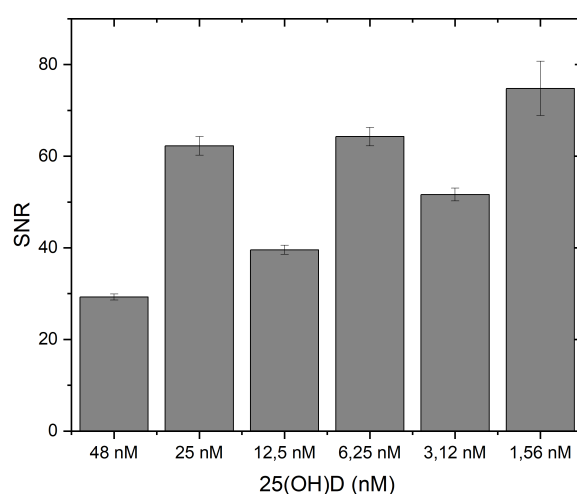
**Abb. 4.24.:** **(a)** Änderung der Fluoreszenzintensität von 100 nM des komplementären, 5'-Cy5-markierten Oligonukleotids 2 bei verschiedenen 25(OH)D-Konzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich. **(b)** Verdrängung von 100 nM des komplementären, 5'-Cy5-markierten Oligonukleotids 2 bei verschiedenen 25(OH)D-Konzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich. Das Microarrayexperiment wurde in Aptamerbindepuffer mit 10 % (v/v) Ethanol durchgeführt und es handelte sich um einen kompetitiven TID-Assay. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde der Chip gewaschen und anschließend die Fluoreszenzintensität mittels GenePix-Scanner und GenePix-Software bestimmt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt ( $N = 3$ ) und aus der Standardabweichung der Signalintensitäten die Fehlerbalken berechnet (a). Für die Darstellung der Verdrängung wurde mittels Formel 4.1 aus den erhaltenen Signalintensitäten die Verdrängung des Oligonukleotids berechnet und gegen die 25(OH)D-Konzentration aufgetragen. Die Fehlerbalken wurden aus dem Standardfehler berechnet. Die finale Bearbeitung erfolgte in Origin 2018.

über die Sensitivität erfolgte, wurden zunächst die SNR-Werte bei den getesteten 25(OH)D-Konzentrationen betrachtet.

### 4.5.2. Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Um die Qualität des Messsignales bei der Detektion von 25(OH)D im nanomolaren Bereich beurteilen zu können, erfolgte die Berechnung der SNR-Werte für jede der getesteten 25(OH)D-Konzentrationen. Die SNR-Werte des TID-Assays im Microarrayformat wurden mittels Formel 4.2 berechnet und anschließend gegen die 25(OH)D-Konzentrationen aufgetragen (Abb. 4.25).

$$\text{SNR} = \frac{\text{Signal} - \text{Hintergrundsignal}}{\text{Standardabweichung Hintergrundsignal}} \quad (4.2)$$



**Abb. 4.25.:** SNR-Werte des kompetitiven TID-Assays bei verschiedenen 25(OH)D-Konzentrationen in Aptamerpuffer mit 10 % (v/v) Ethanol. 12,5 µM VDBA14 wurde zuvor auf der 3D-Microarrayoberfläche in 3x SSC immobilisiert. Anschließend wurde eine serielle Verdünnung von 25(OH)D mit 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotid 2 (finale Konzentration 100 nM) vermischt. 150 µL des Gemisches wurden anschließend in die Reaktionskammern des Chips gegeben und für 1 h schüttelnd inkubiert. Es handelte sich somit um einen kompetitiven TID-Assay. Anschließend wurde der Chip gewaschen und die Fluoreszenzintensität mittels GenePix-Scanner und Software bestimmt. Für die Berechnung des SNR wurde anschließend Formel 4.2 verwendet. Die finale Bearbeitung erfolgte in Origin 2018.

Bei allen getesteten 25(OH)D-Konzentrationen konnten SNR-Werte > 30 erzielt werden. Niedrige 25(OH)D-Konzentrationen resultierten in den höchsten SNR-Werten von bis zu 70. Die niedrigsten SNR-Werte konnten bei 25(OH)D-Konzentrationen von 48 nM und 12,5 nM beobachtet werden. Da das Messrauschen maßgeblich durch das verwendete Messinstrument hervorgerufen wird, wurde in diesem Kapitel das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei der Verwendung des Microarray-Systems bestimmt. Für andere Messmethoden (wie beispielsweise SPR)

können sich bei der Verwendung des TID-Assays andere SNR-Werte ergeben. Durch die Berechnung der SNR-Werte konnte bestätigt werden, dass die Messdaten des Experiments, auf dessen Basis LOD und LOQ berechnet wurden, qualitativ hochwertig waren. So wurde als letzter Charakterisierungsschritt die Nachweis- und Bestimmungsgrenze des kompetitiven TID-Assays zur Detektion von 25(OH)D im Microarrayformat bestimmt.

### 4.5.3. Bestimmung der unteren Messgrenzen (LOQ, LOD)

Für die Charakterisierung von analytischen Messmethoden sind die Bestimmungs- und Nachweisgrenze von hoher Bedeutung. Laut IUPAC-Definition handelt es sich bei der Bestimmungsgrenze (Limit Of Quantification, LOQ) um die geringste Analytkonzentration, welche mit einer statistisch hohen Sicherheit quantifiziert werden kann. Dieser Wert gilt als Limit, an dem mit hoher Wahrscheinlichkeit zwei Messwerte voneinander unterschieden werden können. Dagegen ist die Nachweisgrenze (Limit Of Detection, LOD) die geringste Analytkonzentration, welche von dem Blank unterschieden werden kann. Die LOD gibt die untere Detektionsschwelle des Messprinzips an. Da das Hintergrundrauschen der verwendeten Messmethoden maßgeblich Einfluss auf die Detektion nehmen, fließen Messwerte von Blanks in die LOD und LOQ-Berechnung ein [100]. Daher errechnet sich der LOQ-Wert aus der zehnfachen Standardabweichung des Blanks ( $\sigma_{\text{Blank}}$ ), dividiert durch die Sensitivität ( $S$ ) der Methode. Für die Berechnung des LOD-Wertes wird die dreifache Standardabweichung des Blanks verwendet. Für eine genaue Beschreibung der Vorgehensweise siehe C.4.3. Mithilfe der Formeln 4.3 und 4.4 wurden anschließend die beiden Kennzahlen berechnet.

$$\text{LOQ} = \left( \frac{10\sigma_{\text{Blank}}}{S} \right) \quad (4.3)$$

$$\text{LOD} = \left( \frac{3\sigma_{\text{Blank}}}{S} \right) \quad (4.4)$$

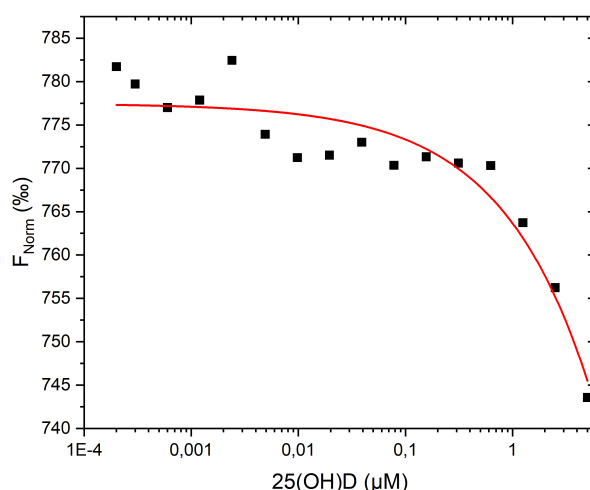
Die Bestimmungsgrenze, LOQ, wurde mit 109 nM 25(OH)D bestimmt. Die Nachweisgrenze, LOD, wurde bei einer 25(OH)D-Konzentration von 32 nM identifiziert.

Der neuentwickelte TID-Assay sollte auch in komplexen Proben (wie beispielsweise Blutproben) mit einer Verdrängung des komplementären Oligonukleotids 2 reagieren. Um dies zu überprüfen wurde im nächsten Abschnitt erneut ein MST-Experiment durchgeführt.



#### 4.5.4. Kompetitiver TID-Assay in Humanserum

In der finalen Anwendung soll der neuentwickelte TID-Assay 25(OH)D in komplexen Proben, wie beispielsweise Humanserum, nachweisen können. Um zu überprüfen, ob es auch in 20 %igem Humanserum zu einer Verdrängung des komplementären Oligonukleotids 2 kommt, wurde dafür ein MST-Experiment durchgeführt. Das gesamte Experiment wurde daher in Aptamerbindepuffer durchgeführt, welcher zu 20 % (v/v) aus Humanserum und 10 % (v/v) Ethanol bestand. Das 5'-Cy5-markierte Oligonukleotid 2 wurde mit einer finalen Konzentration von 10 nM mit einer 25(OH)D-Verdünnungsreihe (ausgehend von 1  $\mu$ M 25(OH)D) vermischt. Es wurde unmarkiertes VDBA14 mit einer Konzentration von 10 nM eingesetzt. Die verschiedenen Ansätze wurden anschließend für 1 h inkubiert (kompetitiver TID-Assay) und dann bei 35 °C in der MST vermessen. Das Ergebnis ist in Abb. 4.26 gezeigt.



**Abb. 4.26.:** Verdrängung des komplementären Oligonukleotids 2 durch 25(OH)D in Aptamerbindepuffer mit 20 % Humanserum und 10 % (v/v) Ethanol. Die Verdrängung von 10 nM des 5'-Cy5-markierten Oligonukleotids 2 wurde mittels MST bestimmt. Für die MST-Messung wurde 25(OH)D zuvor seriell in Aptamerpuffer mit 10 % Ethanol (v/v) verdünnt. Anschließend wurde jede Verdünnungsstufe von 25(OH)D mit VDBA14-Oligonukleotid-Lösung vermischt (finale Oligonukleotidkonzentration 10 nM). Nach einer Inkubation von 1 h wurde die Verdrängung des komplementären Oligonukleotids bei 35 °C mittels MST bestimmt. Die Bindungskurven wurde mit der NT.Analysis Software generiert und in Origin 2018 bearbeitet.

Mit steigender 25(OH)D-Konzentration kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität, was durch die Verdrängung des komplementären, 5'-Cy5-markierten Oligonukleotids 2 verursacht wird. So kann aus diesem MST-Experiment geschlossen werden, dass das Vorhandensein von Humanserum die grundlegende Funktionsweise des TID-Assays nicht beeinträchtigt und

das komplementäre Oligonukleotid weiterhin durch 25(OH)D verdrängt wird. In der Literatur wurde der in dieser Dissertation erarbeitete TID-Assay bereits erfolgreich auf einen portablen Smartphone-Sensor übertragen, welcher in verdünntem Humanserum (10 %) 25(OH)D im niedrigen, nanomolaren Bereich nachweisen konnte [101], was das Ergebnis dieses Experimentes bestätigt.

Für die spätere Verwendung des TID-Assays in der patientennahen Diagnostik (POCT) ist neben der Bestimmungs- und Nachweisgrenze und der Funktionalität in komplexen Matrices auch der Preis pro Test eine wichtige Kennzahl. Daher wurden die Materialkosten der Durchführung eines TID-Assays für die Detektion von 25(OH)D im nächsten Abschnitt geschätzt und anschließend mit einem kommerziell erhältlichen 25(OH)D-Assay verglichen.

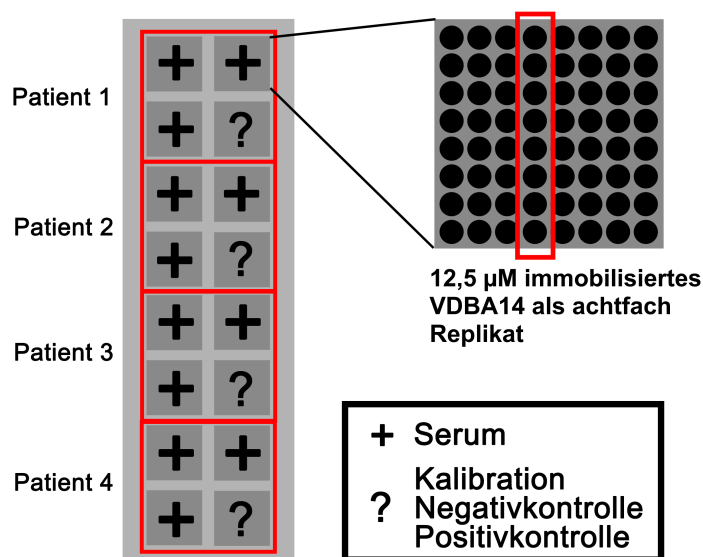
#### **4.5.5. Materialkosten des TID-Assays pro analysierter Probe**

Um den entwickelten TID-Assay für die Detektion von 25(OH)D mit anderen, etablierten Assays vergleichen zu können, ist eine Betrachtung des Preises pro analysierter Probe notwendig. Anschaffungskosten von Geräten und die Preise der verwendeten Puffer wurden nicht einberechnet, lediglich die Preise der verwendeten biologischen Komponenten (und des Microarraychips) wurden in die Berechnung eingezogen.

Durch das TID-basierte Detektionsformat ergeben sich drei Hauptkostenpunkte. Microarrayslides, für die Aptamerimmobilisierung und parallele Analyse von mehreren Patientenproben. Das Aptamer als biologisches Erkennungselement des Biosensors und als letztes das komplementäre Oligonukleotid als transduzierendes Element. In dem Microarrayformat lassen sich auf einem Chip mehrere Analysen parallel durchführen, sodass für eine hypothetische diagnostische Anwendung des Chips vier Patientenproben untersuchen lassen (Abb. 4.27). So werden pro Patientenprobe vier Blöcke verwendet, wobei drei dieser Blöcke für die zu unbekannte, zu analysierende Probe verwendet werden. Der vierte Block kann flexibel für die Kalibration, Negativkontrolle oder Positivkontrolle verwendet werden.

Die Kosten pro Probe des oben gezeigten Microarraychips ergeben sich dadurch wie folgt: 10 Euro Kosten pro Chip. Pro Chip lassen sich vier individuelle Patientenproben analysieren, wodurch sich Materialkosten von € 2,50 pro Probe ergeben.

Das in dieser Dissertation verwendete 25(OH)D-Aptamer (VDBA14) wurde mittels Festphasensynthese hergestellt. Dabei belaufen sich die Kosten für 3 mL HPLC-aufgereinigtes Aptamer (mit einer finalen Konzentration von 12,5  $\mu$ M) auf € 760. Pro Milliliter Aptamer ergeben sich dadurch Kosten von € 253,3. Mit der gleichen Kalkulation lassen sich die Kosten des Oligonu-



**Abb. 4.27.:** Hypothetischer, multiparalleler Ansatz für die 25(OH)D-Analytik im Microarray-Format. Durch 16 voneinander abgegrenzte Reaktionskammern eines Microarraychips, können verschiedene Proben gleichzeitig analysiert werden. In dem hier gezeigten Beispiel ist es so möglich, den 25(OH)D-Spiegel von vier Patienten gleichzeitig zu bestimmen. Dabei werden pro Patient vier Blöcke verwendet. Drei Blöcke (+) werden als Replikate für die 25(OH)D-Messung verwendet. Der letzte Block (?) kann flexibel eingesetzt werden. So ist in diesem Block beispielsweise der Einsatz für eine Kalibration, Negativ- oder Positivkontrolle denkbar.

kleotids berechnen. Die Kosten pro Milliliter Oligonukleotid (mit einer finalen Konzentration von 250 nM) belaufen sich so auf ca. € 6.

Für die Aptamerimmobilisierung wurden pro Aptamerspot sechs Tropfen auf die Microarrayoberfläche gedruckt. Ein Tropfen besitzt dabei ein Volumen von ca. 1,1 Nanoliter (laut Hersteller des Spottinggerätes). Dadurch ergibt sich ein Aptamerverbrauch von 6,6 Nanoliter pro Spot. Insgesamt werden in dem gezeigten Chiplayout (Abb. 4.27) acht Replikate der gewünschten VDBA14-Konzentration immobilisiert. Daraus ergibt sich ein Aptamerverbrauch von 52,8 Nanoliter pro Block. Pro Patientenprobe werden vier Blöcke verwendet, was einem Gesamtaptamerverbrauch von 211,2 Nanoliter pro Probe entspricht. Wird dies mit dem oben genannten Aptamerpreis pro Milliliter verrechnet, ergeben sich Aptamerkosten von etwas mehr als 5 Cent pro Probe.

Für den eigentlichen TID-Assay werden pro Block 150 µL Oligonukleotid mit einer finalen Konzentration von 10 nM eingesetzt. Da vier Blöcke pro Probe verwendet werden, entspricht dies einem Verbrauch von 600 µL Oligonukleotid pro Probe. Für die Verdünnung der Stocklösung

auf 600  $\mu$ L dieser Endkonzentration werden 48  $\mu$ L benötigt. Wird dies mit den oben genannten Oligonukleotidkosten pro Milliliter verrechnet, entspricht dies 29 Cent pro Probe.

€ 2,50 pro Probe Microarraychip

€ 0,05 pro Probe Aptamerkosten

€ 0,29 pro Probe Oligonukleotidkosten

Zusammenfassend belaufen sich die hypothetischen Kosten für die Analyse einer Probe des in dieser Dissertation entwickelten TID-basierten 25(OH)D-Assay auf € 2,84.

#### **4.5.6. Vergleich des entwickelten TID-Assays mit dem Stand der Technik**

Der in dieser Dissertation entwickelte TID-Assay konnte erfolgreich für die Detektion von 25(OH)D im nanomolaren Konzentrationsbereich eingesetzt werden. Weiterhin wurde eine Schätzung der Materialkosten durchgeführt, um den Assay mit anderen, etablierten Methoden vergleichen zu können. In diesem Kapitel werden die Eigenschaften des TID-Assays mit dem Stand der Technik der 25(OH)D-Detektion verglichen. Der Elecsys 25(OH)D-Assay von Roche ist neben der anerkannten Referenzmethode (LC-MS/MS) einer der sensitivsten und schnellsten Nachweismethoden von 25(OH)D. Für einen Vergleich des Elecsysassays mit dem neuentwickelten TID-Assay siehe Tab. 4.9. Alle gezeigten Parameter beziehen sich auf die 25(OH)D-Detektion in Puffer, nicht in komplexen biologischen Proben, wie Serum.

Der kommerziell erhältliche 25(OH)D-Assay verfügt über eine geringe Testdauer von 27 Minuten. Die Testdauer des, in dieser Dissertation entwickelten, TID-Assays beträgt ca. 60 Minuten. Den größten Einfluss auf die Testdauer des TID-Assays hat die Inkubationszeit für die kompetitive Reaktion zwischen 25(OH)D und Oligonukleotid. In der vorliegenden Arbeit konnten mit einstündigen Inkubationszeiten bereits eine Verdrängung des Oligonukleotids im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich beobachtet werden. Weitere Verkürzungen der Inkubationszeit sind möglich, müssen jedoch gründlich evaluiert werden. Da die TID-Reaktion auf einem komplexen Geflecht aus Gleichgewichtszuständen besteht, kann sich eine Verkürzung der Inkubationszeit auch auf die Sensitivität des TID-Assays auswirken. Die Nachweisgrenze, LOD, liegt bei dem Aptamer-basierten TID-Assay bei 32 nM wohingegen der kommerzielle Elecsys-Assay einen LOD-Wert von 7,5 nM aufweist. Die Bestimmungsgrenze (LOQ) des Elecsys-Assays liegt bei 12,5 nM, wohingegen bei dem TID-Assay eine Bestimmungsgrenze von ca. 109 nM ermittelt wurde. Für die 25(OH)D-Detektion im diagnostischen Bereich ist mit dem entwickelten TID-Assay eine Ja/Nein-Aussage über eine mögliche Vitamin D-Insuffizienz möglich, da 25(OH)D-Konzentrationen unter 50 nM mit dem Assay detektiert werden können (LOD

**Tab. 4.9.:** Vergleich des kommerziell erhältlichen Elecsys 25(OH)D-Assay mit dem, in dieser Arbeit entwickelten, TID-Assay für die Detektion von 25(OH)D. Die Materialkosten wurden für die Verwendung im Cobas e 411 Analyzer berechnet. € 1719 für 100 Tests im Elecsys-Assayformat (Roche Diagnostics Preisliste 2020 - Diagnostika und Laborgeräte, Zugriff 10.01.21). Berechnung der Materialkosten für den entwickelten TID-Assay siehe Kapitel 4.5.5.

	Elecsys 25(OH)D Assay	25(OH)D TID-Assay
Testdauer	27 min	ca. 60 min
Testprinzip	Proteinbindungsassay	TID-Assay
<i>Limit of Detection</i> (LoD)	7,5 nM	32 nM
<i>Limit of Quantification</i> (LoQ)	12,5 nM	109 nM
Messbereich	7,5 nM bis 250 nM	32 nM bis 2 µM
Preis pro zu analysierender Probe	€ 17,20	ca. € 2,84

= 30 nM). Für eine hochpräzise Quantifizierung von 25(OH)D muss der TID-Assay jedoch in Zukunft hinsichtlich des LOQ-Wertes weiter optimiert werden, da dieser über den Schwellenwerten von < 50 nM liegt (LOQ = 109 nM). Der Elecsys 25(OH)D-Assay zeichnet sich durch einen breiten Messbereich aus (7,5 nM bis 250 nM), wobei der aptamerbasierte TID-Assay sogar einen Messbereich von 32 nM (LOD) bis 2 µM 25(OH)D aufweist. Der obere Konzentrationsbereich ist für die Bestimmung des Vitamin D-Gesundheitsmarkers nicht relevant, da Werte über 250 nM vernachlässigt werden und generell nicht in realen, diagnostischen Anwendungen vorkommen. Werden lediglich Materialkosten betrachtet, ist der aptamerbasierte TID-Assay pro Probe sechs mal günstiger, als der kommerziell erhältliche Elecsys 25(OH)D-Assay.

Das Detektionsprinzip des kommerziellen Assays beruht auf einer Konkurrenz zwischen dem zu untersuchenden 25(OH)D und biotinyliertem 25(OH)D. Dabei konkurrieren die ungelabelten 25(OH)D-Moleküle mit biotinyliertem 25(OH)D um Bindungsplätze von VDBP. Die Detektion erfolgt anschließend optisch über die biotinylierten 25(OH)D-Moleküle. Bevor diese Konkurrenzreaktion jedoch stattfindet, muss das natürlich vorkommende VDBP in der Blutprobe denaturiert und entfernt werden. Dafür werden zwei Vorbehandlungsagenzien eingesetzt. Auch in dem TID-Assay, welcher in dieser Arbeit entwickelt wurde, ist dieser Schritt in der späteren Anwendung notwendig, da 99 % des im Körper vorkommenden 25(OH)D an das VDBP gebunden ist. In dem Elecsys-System wird zusätzlich ein Antikörper eingesetzt, welcher die Kreuzreaktivität mit anderen 25(OH)D-Vorstufen hemmt. Das in in dieser Dissertation verwendete VDBA14 ist hochselektiv in Bezug auf 25(OH)D, sodass zusätzliche Agenzien in der späteren Anwendung wahrscheinlich nicht nötig sind. So konnte in Kapitel 4.1.3 gezeigt werden, dass das Vorläufermolekül Vitamin D nicht von VDBA14 gebunden wird.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurde ein TID-Assay für die Detektion des kleinen Moleküls 25(OH)D entwickelt. Zum Nachweis von Vitamin D-Mangel und Vitamin D-Insuffizienz muss die Nachweismethode hochsensitiv sein, da der 25(OH)D-Spiegel bei diesen Mangelerscheinungen im nanomolaren Konzentrationsbereich liegt. Neben der Verwendung von Antikörpern für die sensitive Detektion von kleinen Molekülen, wie beispielsweise 25(OH)D, hat sich in den letzten Jahrzehnten auch die Verwendung von Aptameren etabliert. Diese sind ebenfalls in der Lage, ihre Zielmoleküle spezifisch zu binden. Die günstige Synthese, hohe Stabilität und Regenerationsfähigkeit von Aptameren machen sie zu einer idealen Alternative zu den etablierten Antikörpern.

Der Fokus dieser Dissertation lag auf der Entwicklung und Evaluierung eines TID-Assays. Bei dem TID-Assay handelt es sich um einen Detektionsmechanismus, bei dem ein komplementäres Oligonukleotid eingesetzt wird, welches an das Aptamer bindet. Bei Vorhandensein des Analytmoleküls wird dieses Oligonukleotid vom Aptamer verdrängt. Durch die Verdrängung kann anschließend eine Signaländerung gemessen werden, da das Oligonukleotid mit einer Markierung versehen werden kann. Im ersten Schritt der Dissertation wurde das 25(OH)D-bindende Aptamer charakterisiert. Aufgrund des hohen GC-Gehaltes des Aptamers wurde das Vorhandensein von G-Quadruplex-Strukturen vermutet. In CD-Spektroskopischen Aufnahmen konnte dies jedoch ausgeschlossen werden. Auch bei der Zugabe des 25(OH)D-Moleküls konnte mittels CD-Spektrum keine drastische strukturelle Änderung des Aptamers beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass das Target an bereits vorgeformte Strukturelemente des Aptamers bindet (Kapitel 4.1.1). Um die Ausbildung eines Aptamer-25(OH)D-Komplexes nachzuweisen, wurde im nächsten Schritt mittels MST eine Bindungskurve bei Raumtemperatur aufgenommen, welche jedoch zu keinem messbaren Bindungsereignis führte. Durch eine Erhöhung der Temperatur während des MST-Laufes auf 35 °C konnte eine Bindung von VDBA14 an 25(OH)D detektiert werden. Bei erhöhter Temperatur werden wahrscheinlich die bereits vorgeformten Strukturelemente (vermutlich ein Stem-Bereich) destabilisiert und entfaltet. Durch Zugabe von 25(OH)D werden diese Strukturelemente wieder stabilisiert bzw. ausgebildet. Diese Vermutung konnte mit einer NUPACK-Strukturanalyse verifiziert werden, sodass sich anschließend diese strukturellen Änderungen auch in einem weiteren MST-Experiment detektieren ließen. Die  $K_d$  des Aptamers wurde mit 14 nM bestimmt (Kapitel 4.1.2), was einer hohen Affinität des Aptamers entspricht.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Charakterisierung von Aptameren ist die Spezifität des Aptamers. Da der TID-Assay in der späteren Anwendung (wie beispielsweise in einem Aptasensor) zwischen einer Reihe von Vitamin D-Metaboliten im Blut selektieren muss, wurde in Kapitel 4.1.3 erneut eine MST mit einem strukturell verwandten Molekül durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das Aptamer zwischen Cholecalciferol (besitzt keine Hydroxylgruppe am C25-Atom) und 25(OH)D unterscheiden kann und spezifisch an 25(OH)D bindet. Nachdem die Charakterisierung des verwendeten 25(OH)D-Aptamers abgeschlossen wurde, erfolgte im nächsten Schritt die eigentliche Entwicklung des TID-Assays. Für einen funktionsfähigen TID-Assay werden Oligonukleotide benötigt, welche komplementär an das Aptamer binden. Drei komplementäre Oligonukleotide mit einer Länge von 10 nt wurden synthetisiert und mit einer 5'-Cy5-Fluoreszenzmarkierung versehen (Kapitel 4.2.1). In ersten MST-Hybridisierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die drei Oligonukleotide in der Lage sind, an das Aptamer zu binden (Kapitel 4.2.2). In einem weiteren MST-Experiment wurden anschließend die Dissoziationskonstanten der Oligonukleotide im kompetitiven TID-Assay untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die drei komplementären Oligonukleotide erfolgreich durch 25(OH)D verdrängt werden (Kapitel 4.2.2). Die Verwendung von Oligonukleotid 2 führte zu einer Verdrängungsreaktion über einen breiten 25(OH)D-Konzentrationsbereich, weshalb dieses Oligonukleotid für die weiteren experimentellen Arbeiten verwendet wurde.

Bei aptamerbasierten Detektionsmethoden sind die Aptamere häufig auf einer Oberfläche immobilisiert. Dadurch ist es möglich, die Aptamere zu regenerieren oder labelfreie Detektionsmethoden wie beispielsweise SPR zu verwenden. Weiterhin ist eine Immobilisierung des Aptamers für die erfolgreiche Verwendung im TID-Assay nötig. Durch die vorangegangenen Experimente wurde gezeigt, dass das Aptamer in Lösung in der Lage ist, 25(OH)D mit einer hohen Affinität zu binden. Weiterhin konnte eine Verdrängung der komplementären Oligonukleotide bei steigender 25(OH)D-Konzentration gezeigt werden. Werden immobilisierte Aptamere verwendet, kann dies die Aptameraktivität negativ beeinflussen. Durch die räumliche Nähe der Aptamere auf der Oberfläche kann es zu intermolekularen Wechselwirkungen und damit strukturellen Hinderungen zwischen den Aptameren kommen. Daher wurde der Immobilisierungsschritt besonders gründlich untersucht, um die optimalen Bedingungen für eine maximierte Oligonukleotidverdrängung zu bestimmen. Es wurde festgestellt, dass ab einer Aptamerkonzentration von 12,5  $\mu$ M eine Aptamersättigung auf der Oberfläche vorliegt (Kapitel 4.3.3). Weiterhin wurden verschiedene Puffer (PBS-Puffer, Aptamerbindepuffer und 3x SSC) hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Immobilisierungseffizienz evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass 3x SSC die höchste Immobilisierungseffizienz aufwies, was sich in hohen Fluoreszenzintensitäten nach einer SYBR<sup>®</sup> Green I/II-Färbung zeigte (Kapitel 4.3.3). Da die Aptameraktivität durch

die Immobilisierung eingeschränkt werden kann, wurde im anschließenden Schritt mit den optimierten Microarray-Bedingungen (Verwendung 3x SSC für die Immobilisierung, Immobilisierungsdichte des Aptamers 12,5  $\mu\text{M}$  und 6  $\mu\text{M}$ ) die Verdrängung des komplementären Oligonukleotids 2 bei verschiedenen 25(OH)D-Konzentrationen untersucht. Ab einer 25(OH)D-Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  konnten so 80 % des Cy5-markierten Oligonukleotids 2 verdrängt werden. Ein signifikanter Unterschied in der Verdrängung zwischen den beiden getesteten Immobilisierungsdichten konnte nicht beobachtet werden. Auch Aptamerdichten am vorher bestimmten Sättigungspunkt (12,5  $\mu\text{M}$ ) führten zu keiner Absenkung der Oligonukleotidverdrängung (Kapitel 4.3.4). Nachdem gezeigt wurde, dass die komplementären Oligonukleotide konzentrationsabhängig von 25(OH)D verdrängt werden, erfolgte in den nächsten Kapiteln eine weitere Optimierung der Verdrängungsreaktion. So wurden zwei Spacer hinsichtlich der Auswirkung auf die Immobilisierungseffizienz miteinander verglichen. Durch die Verwendung von Spacern können sterische Hinderungen zwischen Aptamer und Immobilisierungsoberfläche minimiert werden, was sich in einer gesteigerter TID-Effektivität zeigen könnte. Die Verwendung des C6-Spacers führte zu einer erhöhten Immobilisierungseffizienz, verglichen mit dem C12-Spacer. Bei dem nachfolgenden TID-Assay führten beide Spacerlängen zu ähnlichen Verdrängungen. Somit wurden für die weiteren Microarrayexperimente C6-Spacer für die Immobilisierung verwendet, da die Verwendung dieses Spacers zu höheren Fluoreszenzintensitäten führte (Kapitel 4.4.1).

In den ersten Verdrängungsexperimenten in der MST führte die Verwendung des Oligonukleotids 2 zu einer Verdrängungsreaktion über einen breiten 25(OH)D-Konzentrationsbereich. Dies ist für die spätere Anwendung in der diagnostischen 25(OH)D-Bestimmung von Vorteil. Auf Basis dieses Experimentes, wurde für die weiteren Experimente dieses Oligonukleotid verwendet (Kapitel 4.2.2). Um zu überprüfen, ob sich dieses Verhalten auch im Microarrayformat zeigt, wurde anschließend Oligonukleotid 2 mit Oligonukleotid 3 hinsichtlich der Verdrängung verglichen. Die Verwendung von Oligonukleotid 2 und einer VDBA14-Immobilisierungskonzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  führte zu höheren Sensitivitäten (Evaluation mittels  $K_{25}$ -Wert). Weiterhin konnte durch die Verwendung von Oligonukleotid 2 ein breiteres 25(OH)D-Konzentrationspektrum abgedeckt werden ( $K_{75}$ -Wert), was sich auch bereits in den MST-Experimenten abgezeichnet hatte (Kapitel 4.4.2).

Aufgrund der vorangegangenen Optimierungen wurden folgende Bedingungen für die finalen 25(OH)D-Bestimmungen verwendet: 3D-Aldehydchips, C6-Spacer, 12,5  $\mu\text{M}$  VDBA14 bei Immobilisierung in 3x SSC-Puffer, Verwendung von Oligonukleotid 2. Die abschließende Charakterisierung hinsichtlich Signal-To-Noise-Ratio und LOD bzw. LOQ des entwickelten TID-Assays erfolgte mit den oben genannten, experimentell bestimmten Bedingungen. Hierfür wurde ein



25(OH)D-Konzentrationsbereich von 1,5 nM bis 48 nM 25(OH)D betrachtet, da der TID-Assay in der POCT-Anwendung in diesem Bereich besonders empfindlich auf Konzentrationsänderungen reagieren sollte. Die Abstufungen zwischen ausreichender Vitamin D-Versorgung, Vitamin D-Insuffizienz und Vitamin D-Mangel liegen in diesem Konzentrationsbereich. Es konnte gezeigt werden, dass ab einer Konzentration von  $> 1,5$  nM 25(OH)D eine Verdrängung des Oligonukleotids beobachtet werden kann. Dabei beträgt die Verdrängung bei 48 nM 25(OH)D 30 % des Cy5-markierten Oligonukleotids. Abschließend wurde der LOD-Wert mit 32 nM und LOQ-Wert mit 109 nM bestimmt. Weiterhin konnte ein lineares Verhalten des TID-Assays in dem Konzentrationsbereich von ca. 1,5 nM bis 12 nM bestimmt werden. Die Unterscheidung von Vitamin D-Insuffizienz und einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung (Ja/Nein-Aussage) ist anhand des bestimmten LOD-Wertes von 30 nM prinzipiell möglich. Für eine Bestimmung von Vitamin D-Mangel (Konzentrationen  $< 25$  nM 25(OH)D) muss der etablierte TID-Assay jedoch hinsichtlich der Sensitivität weiter optimiert werden (LOQ-Wert verringern). In ersten MST-Experimenten konnte in dieser Dissertation ebenfalls gezeigt werden, dass die Verdrängung des Oligonukleotids auch in 20 % Humanserum beobachtet werden kann. Weitere Experimente, auch im Microarrayformat, in Humanserum sind jedoch zwingend notwendig, da dies die reale Anwendung des TID-Assays in der späteren Anwendung darstellt. Daher muss besonders bei der Verwendung von Humanserum eine Reihe von Faktoren beachtet werden. Zum Einen zirkulieren ca. 99 % der 25(OH)D-Moleküle gebunden im Körper. Das Vitamin D-bindende Protein übernimmt die Aufgabe des 25(OH)D-Transportes durch den Körper und bindet hochaffin an das kleine Molekül. In klinisch durchgeführten 25(OH)D-Assays (wie dem Elecsys-Systems von Roche Diagnostics) wird daher die Probe des Patienten vor dem Assay mit denaturierenden Agenzien behandelt, um das Protein zu denaturieren. Dadurch wird 25(OH)D vom VDBP gelöst und kann im Assay detektiert werden. Auch in dem, in dieser Dissertation, entwickelten TID-Assay ist dieser Denaturierungsschritt nötig, um eine Detektion zu gewährleisten. Der Einfluss dieser Denaturierung auf das Aptamer sollte daher in Zukunft ebenfalls untersucht werden, um die Denaturierungsmethode gegebenenfalls anzupassen. Ein erheblicher Vorteil des TID-Assays gegenüber dem Elecsys-Systems ist ein niedriger Preis pro Probe (€ 2,84), welcher bei einer Massenproduktion wahrscheinlich noch geringer ausfallen könnte. Für die spätere Verwendung des TID-Assays in POCT-Anwendungen sollte die Nukleaseaktivität der, im Blut vorhandenen, DNA-abbauenden Enzyme vor Durchführung des TID-Assays herabgesetzt werden. Die Nukleasen sind in der Lage das frei zirkulierende Oligonukleotid zu degradieren und die Detektionseffizienz negativ zu beeinträchtigen. Das immobilisierte VD-BA14 ist durch die Immobilisierung stabilisiert und kann nicht so leicht, wie die Oligonukleotide durch Nukleasen abgebaut werden. Der Einfluss der Nukleasen muss jedoch in Zukunft

empirisch überprüft werden, damit der TID-Assay in realen POCT-Anwendungen verwendet werden kann. Für die Hemmung dieser Enzyme eignen sich chemische Inhibitoren, wie beispielsweise EGTA, SDS oder eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenstärke im Aptamerbindepuffer. Der Zusatz dieser Stoffe muss jedoch hinsichtlich der Beeinflussung der Aptamerspezifität evaluiert werden.

Für die angestrebte POCT-Anwendung des entwickelten TID-Assays ist die einfache Übertragung des Assays auf eine Vielzahl von Sensorformaten ebenfalls ein Vorteil des Assayprinzips. So kann der TID-Assay auf jede Aptasensorplattform übertragen werden, bei der das Aptamer immobilisiert vorliegt. Durch eine hohe Flexibilität bei der Oligonukleotidmarkierung lassen sich weiterhin viele Transduktionsmethoden realisieren. In der Literatur konnte der in dieser Arbeit etablierte TID-Assay bereits auf einen Smartphone-basierten Sensor übertragen werden. Der Sensor war in der Lage 25(OH)D in niedrigen nanomolaren Konzentrationen in 10 % Humanserum nachzuweisen. Weiterhin ist es denkbar, den TID-Assay auf Schnelltests, wie beispielsweise Lateral Flow-Systeme zu übertragen. In diesen, auch als Schwangerschaftstest bekannten, Systemen liegt das Aptamer üblicherweise ebenfalls immobilisiert vor. Durch die Markierung des komplementären Oligonukleotids mit AuNPs kann der Test anschließend optisch ausgewertet werden. Der zeitliche Faktor des Schnelltests ist jedoch entscheidend, da genügend Zeit für die (nahezu) komplette Verdrängung des Oligonukleotids benötigt wird. Eine Übertragung des TID-Assays auf andere Sensorsysteme kann auch zu der gewünschten Verringerung des LOQ-Wertes führen, da die ermittelten Detektionsgrenzen hauptsächlich durch das Messrauschen des verwendeten Systems limitiert sind.

## A. Literaturverzeichnis

- [1] Michael Dougherty, Thomas; Pucci. *Antibiotic Discovery and Development*. Springer US, Boston, MA, 2012.
- [2] William M. Pardridge. Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology, jul 1995.
- [3] Hossein Jahangirian, Katayoon Kalantari, Zahra Izadiyan, Roshanak Rafiee-Moghaddam, Kamyar Shamel, and Thomas J. Webster. A review of small molecules and drug delivery applications using gold and iron nanoparticles, 2019.
- [4] Riikka Peltomaa, Bettina Glahn-Martínez, Elena Benito-Peña, and María C. Moreno-Bondi. Optical Biosensors for Label-Free Detection of Small Molecules, nov 2018.
- [5] Chunjing Feng, Shuang Dai, and Lei Wang. Optical aptasensors for quantitative detection of small biomolecules: A review, sep 2014.
- [6] Ciara K. O’Sullivan. Aptasensors - The future of biosensing?, 2002.
- [7] Franziska Pfeiffer and Günter Mayer. Selection and biosensor application of aptamers for small molecules, jun 2016.
- [8] Wendy L Arneson and Dean L Arneson. Current Methods for Routine Clinical Laboratory Testing of Vitamin D Levels. *Laboratory Medicine*, 44(1):e38–e42, feb 2013.
- [9] Janice B Schwartz, J Christopher Gallagher, Rolf Jorde, Vivian Berg, Jennifer Walsh, Richard Eastell, Amy L Evans, Simon Bowles, Kim E Naylor, Kerry S Jones, Inez Schoenmakers, Michael Holick, Eric Orwoll, Carrie Nielson, Martin Kaufmann, Glenville Jones, Roger Bouillon, Jennifer Lai, Davide Verotta, and Daniel Bikle. Determination of Free 25(OH)D Concentrations and Their Relationships to Total 25(OH)D in Multiple Clinical Populations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 103(9):3278–3288, sep 2018.
- [10] Michael F. Holick. Medical progress: Vitamin D deficiency, jul 2007.
- [11] William B. Grant, Heide S. Cross, Cedric F. Garland, Edward D. Gorham, Johan Moan, Meinrad Peterlik, Alina C. Porojnicu, Jörg Reichrath, and Armin Zittermann. Estimated

- benefit of increased vitamin D status in reducing the economic burden of disease in western Europe. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 99(2-3):104–113, 2009.
- [12] Kevin D. Cashman, Kirsten G. Dowling, Zuzana Škrabáková, Marcela Gonzalez-Gross, Jara Valtueña, Stefaan De Henauw, Luis Moreno, Camilla T. Damsgaard, Kim F. Michaelsen, Christian Mølgaard, Rolf Jorde, Guri Grimnes, George Moschonis, Christina Mavrogianni, Yannis Manios, Michael Thamm, Gert B.M. Mensink, Martina Rabenberg, Markus A. Busch, Lorna Cox, Sarah Meadows, Gail Goldberg, Ann Prentice, Jacqueline M. Dekker, Giel Nijpels, Stefan Pilz, Karin M. Swart, Natasja M. Van Schoor, Paul Lips, Gudny Eiríksdóttir, Vilmundur Gudnason, Mary Frances Cotch, Seppo Koskinen, Christel Lamberg-Allardt, Ramon A. Durazo-Arvizu, Christopher T. Sempos, and Mairead Kiely. Vitamin D deficiency in Europe: Pandemic? *American Journal of Clinical Nutrition*, 103(4):1033–1044, 2016.
- [13] Felicia Wu, John D. Groopman, and James J. Pestka. Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1):351–372, feb 2014.
- [14] John L. Richard. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2):3–10, oct 2007.
- [15] Josephine Borja, Donna Marie Taleon, Joseph Auresenia, and Susan Gallardo. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation, may 2005.
- [16] Jaytry Mehta, Elsa Rouah-Martin, Bieke Van Dorst, Bert Maes, Wouter Herrebout, Marie Louise Scippo, Freddy Dardenne, Ronny Blust, and Johan Robbens. Selection and characterization of PCB-binding DNA aptamers. *Analytical Chemistry*, 84(3):1669–1676, feb 2012.
- [17] Shahla Hosseini Bai and Steven M. Ogbourne. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19):18988–19001, oct 2016.
- [18] N. Defarge, J. Spiroux de Vendômois, and G. E. Séralini. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Toxicology Reports*, 5:156–163, jan 2018.
- [19] Tim aus der Beek, Frank Andreas Weber, Axel Bergmann, Silke Hickmann, Ina Ebert, Arne Hein, and Anette Küster. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4):823–835, apr 2016.

- [20] David H. Wilson, William Groskopf, Stephen Hsu, Diane Caplan, Tom Langner, Michael Baumann, Deborah Demanno, Gregg Williams, Don Payette, Cheryl Dagel, Don Lynch, and George Manderino. Rapid, automated assay for progesterone on the Abbott Ax-SYM(TM) analyzer. *Clinical Chemistry*, 44(1):86–91, 1998.
- [21] Bang Hyun Lee, Van Thuan Nguyen, and Man Bock Gu. Highly sensitive detection of 25-HydroxyvitaminD3 by using a target-induced displacement of aptamer. *Biosensors and Bioelectronics*, 88:174–180, feb 2017.
- [22] John G. Haddad and Kyung Ja Chyu. COMPETITIVE PROTEIN-BINDING RADIOASSAY FOR 25-HYDROXYCHOLECALCIFEROL <sup>1</sup>. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 33(6):992–995, dec 1971.
- [23] Michael F. Holick. The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: A unique photoendocrine system. *Journal of Investigative Dermatology*, 77(1):51–58, 1981.
- [24] Daniel D. Bikle, Sofie Malmstroem, and Janice Schwartz. Current Controversies: Are Free Vitamin Metabolite Levels a More Accurate Assessment of Vitamin D Status than Total Levels?, dec 2017.
- [25] Robert P. Heaney. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *The American journal of clinical nutrition*, 80(6 Suppl):1706S–1709S, dec 2004.
- [26] Paul Lips, M. C. Chapuy, B. Dawson-Hughes, H. A.P. Pols, and M. F. Holick. An International comparison of serum 25-hydroxyvitamin D measurements. *Osteoporosis International*, 9(5):394–397, 1999.
- [27] Frieder W. Scheller, Ulla Wollenberger, Axel Warsinke, and Fred Lisdat. Research and development in biosensors, sep 2001.
- [28] Leland C. Clark and Champ Lyons. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102(1):29–45, oct 1962.
- [29] Andrew D. Ellington and Jack W. Szostak. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287):818–822, 1990.

- [30] Craig Tuerk and Larry Gold. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968):505–510, aug 1990.
- [31] Hongguang Sun and Youli Zu. A Highlight of recent advances in aptamer technology and its application, jul 2015.
- [32] Harleen Kaur, John G. Bruno, Amit Kumar, and Tarun Kumar Sharma. Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines, 2018.
- [33] Michaela Vorlíčková, Iva Kejnovská, Klára Bednářová, Daniel Renčiuk, and Jaroslav Kypr. Circular dichroism spectroscopy of DNA: From duplexes to quadruplexes. In *Chirality*, volume 24, pages 691–698, 2012.
- [34] Vasso Skouridou, Miriam Jauset-Rubio, Pablo Ballester, Abdulaziz S. Bashammakh, Mohammad S. El-Shahawi, Abdulrahman O. Alyoubi, and Ciara K. O’Sullivan. Selection and characterization of DNA aptamers against the steroid testosterone. *Microchimica Acta*, 184(6):1631–1639, jun 2017.
- [35] Muslum Ilgu and Marit Nilsen-Hamilton. Aptamers in analytics, mar 2016.
- [36] Debmalya Bhattacharyya, Gayan Mirihana Arachchilage, and Soumitra Basu. Metal cations in G-quadruplex folding and stability. *Frontiers in Chemistry*, 4(SEP), 2016.
- [37] Michael Famulok and Günter Mayer. Aptamer modules as sensors and detectors. *Accounts of Chemical Research*, 44(12):1349–1358, dec 2011.
- [38] Maureen McKeague and Maria C DeRosa. Challenges and Opportunities for Small Molecule Aptamer Development. *Journal of Nucleic Acids*, 2012:748913, 2012.
- [39] Annamaria Ruscito and Maria C. DeRosa. Small-molecule binding aptamers: Selection strategies, characterization, and applications. *Frontiers in Chemistry*, 4(MAY):14, may 2016.
- [40] Gergely Lautner, Zsófia Balogh, Viola Bardóczy, Tamás Mészáros, and Róbert E. Gyurcsányi. Aptamer-based biochips for label-free detection of plant virus coat proteins by SPR imaging. *Analyst*, 135(5):918–926, 2010.
- [41] Mohammed N. Alnajrani and Omar A. Alsager. Lateral flow aptasensor for progesterone: Competitive target recognition and displacement of short complementary sequences. *Analytical Biochemistry*, 587:113461, dec 2019.

- [42] Atul Sharma, Gaëlle Catanante, Akhtar Hayat, Georges Istamboulie, Ines Ben Rejeb, Sunil Bhand, and Jean Louis Marty. Development of structure switching aptamer assay for detection of aflatoxin M1 in milk sample. *Talanta*, 158:35–41, sep 2016.
- [43] Binh Hai Nguyen, Lam Dai Tran, Quan Phuc Do, Huy Le Nguyen, Ngoc Huan Tran, and Phuc Xuan Nguyen. Label-free detection of aflatoxin M1 with electrochemical Fe 3O4/polyaniline-based aptasensor. *Materials Science and Engineering C*, 33(4):2229–2234, may 2013.
- [44] Sathya Srinivasan, Velu Ranganathan, Maria C. DeRosa, and Bhaskar Mohan Murari. Comparison of turn-on and ratiometric fluorescent G-quadruplex aptasensor approaches for the detection of ATP. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(7):1319–1330, mar 2019.
- [45] Rania Oueslati, Cheng Cheng, Jayne Wu, and Jiangang Chen. Highly sensitive and specific on-site detection of serum cocaine by a low cost aptasensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 108:103–108, jun 2018.
- [46] Khalil Abnous, Noor Mohammad Danesh, Mohammad Ramezani, Ahmad Sarreshtehdar Emrani, and Seyed Mohammad Taghdisi. A novel colorimetric sandwich aptasensor based on an indirect competitive enzyme-free method for ultrasensitive detection of chloramphenicol. *Biosensors and Bioelectronics*, 78:80–86, apr 2016.
- [47] Yugender Goud, Akhtar Hayat, Gaëlle Catanante, S. M. Satyanarayana, K. Vengatajalabathy Gobi, and Jean Louis Marty. An electrochemical aptasensor based on functionalized graphene oxide assisted electrocatalytic signal amplification of methylene blue for aflatoxin B1 detection. *Electrochimica Acta*, 244:96–103, aug 2017.
- [48] Chao Wang and Qiang Zhao. A competitive thrombin-linked aptamer assay for small molecule: aflatoxin B1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(25):6637–6644, oct 2019.
- [49] Wang Li, Zhou Nie, Xiahong Xu, Qinpeng Shen, Chunyan Deng, Jinhua Chen, and Shouzhao Yao. A sensitive, label free electrochemical aptasensor for ATP detection. *Talanta*, 78(3):954–958, may 2009.
- [50] Yu Mao, Tingting Fan, Rachel Gysbers, Yin Tan, Feng Liu, Shuo Lin, and Yuyang Jiang. A simple and sensitive aptasensor for colorimetric detection of adenosine triphosphate based on unmodified gold nanoparticles. *Talanta*, 168:279–285, jun 2017.

- [51] Weilu Zhou, Weijun Kong, Xiaowen Dou, Ming Zhao, Zhen Ouyang, and Meihua Yang. An aptamer based lateral flow strip for on-site rapid detection of ochratoxin A in *As-tragalus membranaceus*. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1022:102–108, jun 2016.
- [52] Seyed Mohammad Taghdisi, Noor Mohammad Danesh, Hamed Reza Beheshti, Mo-hammad Ramezani, and Khalil Abnous. A novel fluorescent aptasensor based on gold and silica nanoparticles for the ultrasensitive detection of ochratoxin A. *Nanoscale*, 8(6):3439–3446, feb 2016.
- [53] Nahid Tavakkoli, Nasrin Soltani, and Fatemeh Mohammadi. A nanoporous gold-based electrochemical aptasensor for sensitive detection of cocaine. *RSC Advances*, 9(25):14296–14301, may 2019.
- [54] Xinjian Chen, Chenguang Zhou, and Xuefeng Guo. Ultrasensitive Detection and Binding Mechanism of Cocaine in an Aptamer-based Single-molecule Device. *Chinese Journal of Chemistry*, 37(9):897–902, sep 2019.
- [55] Jahangir Ahmad Rather, Emad A. Khudaish, and Palanisamy Kannan. Graphene-amplified femtosensitive aptasensing of estradiol, an endocrine disruptor. *Analyst*, 143(8):1835–1845, apr 2018.
- [56] Noemí De-los Santos-Álvarez, María Jesús Lobo-Castañón, Arturo J. Miranda-Ordieres, and Paulino Tuñón-Blanco. Modified-RNA aptamer-based sensor for competitive impe-dimetric assay of neomycin B. *Journal of the American Chemical Society*, 129(13):3808–3809, apr 2007.
- [57] Kun Han, Zhiqiang Liang, and Nandi Zhou. Design strategies for aptamer-based biosen-sors, may 2010.
- [58] James M Carothers, Jonathan A Goler, Yuvraaj Kapoor, Lesley Lara, and Jay D Keasling. Selecting RNA aptamers for synthetic biology: investigating magnesium dependence and predicting binding affinity. *Nucleic Acids Research*, 38(8):2736–2747, feb 2010.
- [59] Patrick Pfeffer and Holger Gohlke. DrugScoreRNA - Knowledge-based scoring function to predict RNA - Ligand interactions. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 47(5):1868–1876, sep 2007.



- 
- [60] Grant R. Zimmermann, Robert D. Jenison, Catherine L. Wick, Jean Pierre Simorre, and Arthur Pardi. Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA. *Nature Structural Biology*, 4(8):644–649, 1997.
- [61] Michael Famulok and Günter Mayer. Aptamers and SELEX in chemistry & biology. *Chemistry and Biology*, 21(9):1055–1058, 2014.
- [62] Mariia Darmostuk, Silvie Rimpelova, Helena Gbelcova, and Tomas Ruml. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology, sep 2014.
- [63] Shima Eissa, Ayesha Siddiqua, Raja Chinnappan, and Mohammed Zourob. Electrochemical SELEX Technique for the Selection of DNA Aptamers against the Small Molecule 11-Deoxycortisol. *ACS Applied Bio Materials*, 2(6):2624–2632, jun 2019.
- [64] Regina Stoltenburg, Nadia Nikolaus, and Beate Strehlitz. Capture-SELEX: Selection of DNA aptamers for aminoglycoside antibiotics. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1(1):14, 2012.
- [65] Maureen McKeague, Annalisa De Girolamo, Stefania Valenzano, Michelangelo Pascale, Annamaria Ruscito, Ranganathan Velu, Nadine R. Frost, Kayla Hill, McKenzie Smith, Erin M. McConnell, and Maria C. DeRosa. Comprehensive Analytical Comparison of Strategies Used for Small Molecule Aptamer Evaluation. *Analytical Chemistry*, 87(17):8608–8612, sep 2015.
- [66] Sladjana Slavkovic, Merve Altunisik, Oren Reinstein, and Philip E. Johnson. Structure-affinity relationship of the cocaine-binding aptamer with quinine derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(10):2593–2597, may 2015.
- [67] Susanne A.I. Seidel, Patricia M. Dijkman, Wendy A. Lea, Geert van den Bogaart, Moran Jerabek-Willemsen, Ana Lazic, Jeremiah S. Joseph, Prakash Srinivasan, Philipp Baaske, Anton Simeonov, Ilia Katritch, Fernando A. Melo, John E. Ladbury, Gideon Schreiber, Anthony Watts, Dieter Braun, and Stefan Duhr. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions, mar 2013.
- [68] Emilia Schax, Maren Lönne, Thomas Scheper, Shimshon Belkin, and Johanna Gabriela Walter. Aptamer-based depletion of small molecular contaminants: A case study using ochratoxin A. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(6):1016–1025, nov 2015.
- [69] Clemens Entzian and Thomas Schubert. Studying small molecule-aptamer interactions using MicroScale Thermophoresis (MST). *Methods*, 97:27–34, mar 2016.

- [70] Markéta Svobodová, Vasso Skouridou, Mary Luz Botero, Miriam Jauset-Rubio, Thomas Schubert, Abdulaziz S. Bashammakh, Mohammad S. El-Shahawi, Abdulrahman O. Alyoubi, and Ciara K. O'Sullivan. The characterization and validation of  $17\beta$ -estradiol binding aptamers. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 167:14–22, mar 2017.
- [71] Ling Zhou, Du Juan Li, Ling Gai, Jian Ping Wang, and Yan Bin Li. Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 162(1):201–208, feb 2012.
- [72] Xiaohua Que, Xian Chen, Libing Fu, Wenqiang Lai, Junyang Zhuang, Guonan Chen, and Dianping Tang. Platinum-catalyzed hydrogen evolution reaction for sensitive electrochemical immunoassay of tetracycline residues. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 704:111–117, sep 2013.
- [73] Mahmoud Roushani and Faezeh Shahdost-Fard. A highly selective and sensitive cocaine aptasensor based on covalent attachment of the aptamer-functionalized AuNPs onto nanocomposite as the support platform. *Analytica Chimica Acta*, 853(1):214–221, jan 2015.
- [74] Nahla A. Abdelshafi, Jérémy Bell, Knut Rurack, and Rudolf J. Schneider. Microfluidic electrochemical immunosensor for the trace analysis of cocaine in water and body fluids. *Drug Testing and Analysis*, 11(3):492–500, mar 2019.
- [75] Feng Xue, Jingjing Wu, Huaqin Chu, Zhanlong Mei, Yongkang Ye, Jian Liu, Rui Zhang, Chifang Peng, Lei Zheng, and Wei Chen. Electrochemical aptasensor for the determination of bisphenol A in drinking water. *Microchimica Acta*, 180(1-2):109–115, jan 2013.
- [76] Xuefeng Wang, Steeve Reisberg, Nawal Serradji, Guillaume Anquetin, M. C. Pham, Wangsuo Wu, Changzhi Dong, and Benoit Piro. E-assay concept: Detection of bisphenol A with a label-free electrochemical competitive immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*, 53:214–219, mar 2014.
- [77] Akhtar Hayat, Silvana Andreescu, and Jean Louis Marty. Design of PEG-aptamer two piece macromolecules as convenient and integrated sensing platform: Application to the label free detection of small size molecules. *Biosensors and Bioelectronics*, 45(1):168–173, jul 2013.

- [78] Jiaojiao Yang, Picheng Gao, Yixin Liu, Rongxia Li, Hongmin Ma, Bin Du, and Qin Wei. Label-free photoelectrochemical immunosensor for sensitive detection of Ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 64:13–18, feb 2015.
- [79] Bicheng Zhu, Omar A. Alsager, Shalen Kumar, Justin M. Hodgkiss, and Jadranka Travas-Sejdic. Label-free electrochemical aptasensor for femtomolar detection of  $17\beta$ -estradiol. *Biosensors and Bioelectronics*, 70:398–403, aug 2015.
- [80] Sen Zhang, Bin Du, He Li, Xiaodong Xin, Hongmin Ma, Dan Wu, Liangguo Yan, and Qin Wei. Metal ions-based immunosensor for simultaneous determination of estradiol and diethylstilbestrol. *Biosensors and Bioelectronics*, 52:225–231, feb 2014.
- [81] Christopher Price. Regular review: Point of care testing. *British Medical Journal*, 322(7297):1285–1288, 2001.
- [82] Sandeep Kumar Vashist, Peter B. Lippa, Leslie Y. Yeo, Aydogan Ozcan, and John H.T. Luong. Emerging Technologies for Next-Generation Point-of-Care Testing. *Trends in Biotechnology*, 33(11):692–705, 2015.
- [83] Salmaan Kanji, Jennifer Buffie, Brian Hutton, Peter S. Bunting, Avinder Singh, Kevin McDonald, Dean Fergusson, Lauralyn A. McIntyre, and Paul C. Hebert. Reliability of point-of-care testing for glucose measurement in critically ill adults. *Critical Care Medicine*, 33(12):2778–2785, 2005.
- [84] Can Dincer, Richard Bruch, André Kling, Petra S. Dittrich, and Gerald A. Urban. Multiplexed Point-of-Care Testing – xPOCT. *Trends in Biotechnology*, 35(8):728–742, 2017.
- [85] Julie L.V. Shaw. Practical challenges related to point of care testing. *Practical Laboratory Medicine*, 4:22–29, 2016.
- [86] Andreas Ioannis Karsisiotis, Nason Ma’ani Hessari, Ettore Novellino, Gian Piero Spada, Antonio Randazzo, and Mateus Webba da Silva. Topological Characterization of Nucleic Acid G-Quadruplexes by UV Absorption and Circular Dichroism. *Angewandte Chemie*, 123(45):10833–10836, 2011.
- [87] Rafael del Villar-Guerra, John O. Trent, and Jonathan B. Chaires. G-Quadruplex Secondary Structure Obtained from Circular Dichroism Spectroscopy. *Angewandte Chemie*, 130(24):7289–7293, 2018.

- [88] Joseph N. Zadeh, Conrad D. Steenberg, Justin S. Bois, Brian R. Wolfe, Marshall B. Pierce, Asif R. Khan, Robert M. Dirks, and Niles A. Pierce. NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems. *Journal of Computational Chemistry*, 32(1):170–173, 2011.
- [89] Alexandra Heilkenbrinker, Christine Reinemann, Regina Stoltenburg, Johanna Gabriela Walter, André Jochums, Frank Stahl, Stefan Zimmermann, Beate Strehlitz, and Thomas Scheper. Identification of the target binding site of ethanolamine-binding aptamers and its exploitation for ethanolamine detection. *Analytical Chemistry*, 87(1):677–685, jan 2015.
- [90] Ailiang Chen Lu Qiao, Wenjie Yu, He Wang, Junlin He, Shuming Yang, Zhiying Wang. Highly sensitive fluorescent detection of 25-HydroxyvitaminD3 using truncated affinity-improved DNA aptamers. *Authorea*, 7(2):1–16, 2020.
- [91] Ziping Zhang, Cancan Tao, Jungang Yin, Yunhui Wang, and Yanshen Li. Enhancing the response rate of strand displacement-based electrochemical aptamer sensors using bivalent binding aptamer-cDNA probes. *Biosensors and Bioelectronics*, 103:39–44, apr 2018.
- [92] Nikhil Bhalla, Pawan Jolly, Nello Formisano, and Pedro Estrela. Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1):1–8, 2016.
- [93] Subramanian Balamurugan, Anne Obubuafo, Steven A. Soper, and David A. Spivak. Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(4):1009–1021, feb 2008.
- [94] Nalini Raghavachari, Yijia P. Bao, Guangshan Li, Xinying Xie, and Uwe R. Müller. Reduction of autofluorescence on DNA microarrays and slide surfaces by treatment with sodium borohydride. *Analytical Biochemistry*, 312(2):101–105, 2003.
- [95] Hao Cheng, Kai Zhang, Joseph A. Libera, Monica Olvera De La Cruz, and Michael J. Bedzyk. Polynucleotide adsorption to negatively charged surfaces in divalent salt solutions. *Biophysical Journal*, 90(4):1164–1174, 2006.
- [96] Marie Brut. Bringing aptamers into technologies: Impact of spacer terminations. *Applied Physics Letters*, 100(16), 2012.
- [97] Martin Witt, Johanna-Gabriela Walter, and Frank Stahl. Aptamer Microarrays—Current Status and Future Prospects. *Microarrays*, 4(2):115–132, 2015.

- [98] Guohong Zhu, Miriam Lübbecke, Johanna Walter, Frank Stahl, and Thomas Scheper. Characterization of optimal aptamer-microarray binding chemistry and spacer design. *Chemical Engineering and Technology*, 34(12):2022–2028, 2011.
- [99] Michael F. Holick. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets, aug 2006.
- [100] David A Armbruster and Terry Pry. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist. Reviews*, 29 Suppl 1(Suppl 1):S49–S52, aug 2008.
- [101] Johanna-Gabriela Walter, Lourdes S. M. Alwis, Bernhard Roth, and Kort Bremer. All-Optical Planar Polymer Waveguide-Based Biosensor Chip Designed for Smartphone-Assisted Detection of Vitamin D. *Sensors*, 20(23):6771, nov 2020.

## B. Materialien

### B.1. Aptamere

5'-Cy5-markiertes VDBA14

5'-Cy5-AGC-AGC-ACA-GAG-GTC-ATG-GGG-  
GGT-GTG-ACT-TTG-GTG-TGC-CTA-TGC-  
GTG-CTA-CGG-AA-3'

Aminomodifiziertes VDBA14

5'-NH<sub>2</sub>-AGC-AGC-ACA-GAG-GTC-ATG-GGG-  
GGT-GTG-ACT-TTG-GTG-TGC-CTA-TGC-  
GTG-CTA-CGG-AA-3'

### B.2. Cy5-markierte Oligonukleotide

Oligonukleotid 1 (O1)

5'-Cy5-TCA-CAC-CCC-C-3'

Oligonukleotid 2 (O2)

5'-Cy5-CAC-CAA-AGT-C-3'

Oligonukleotid 3 (O3)

5'-Cy5-AAA-GTC-ACA-C-3'

### B.3. Verbrauchsmaterialien

**Tab. B.1.:** Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller
Quartzküvette	Hellma® Halb-Mikro Küvette	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
MST-Kapillare	Monolith NT.115 Capillary	Nanotemper Technology, GmbH (München, DE)
Premium MST-Kapillare	Monolith NT.115 Premium Capillary	Nanotemper Technology, GmbH (München, DE)
96 Well-Platte	Armadillo PCR-Platte, 96-well, durchsichtig	Thermo Fischer Inc. (Glasgow, UK)
2D Microarray-Glasslide	2D-Aldehyd-modifizierter Glasslide	PolyAn GmbH (Berlin, DE)

3D Microarray-Glasslide	3D-Aldehyd-modifizierter Glasslide	PolyAn GmbH (Berlin, DE)
Microarray-Hybridisierungskammer	NEXTERION <sup>®</sup> IC-16	SCHOTT AG (Mainz, DE)
Microarray-Reaktionskammern	Nexterion <sup>®</sup> IC-16 self-adhesive superstructure	SCHOTT AG (Mainz, DE)

## B.4. Laborgeräte

**Tab. B.2.:** Verwendete Laborgeräte.

Laborgerät	Typ	Hersteller
CD-Spektrometer	JASCO J-1000 Spectrophotometer	JASCO (Tokyo, JP)
Aptamerspotter	Arrayer Nano-Plotter NP2.1	GeSiM GmbH (Großerkmannsdorf, DE)
Microarray-Scanner	GenePix 4000B	Molecular Devices LLC (Sunnyvale, USA)
NanoDrop Photometer	NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies Inc. (Wilmington, USA)
NanoDrop Photometer	NanoDrop ND-3300	NanoDrop Technologies Inc. (Wilmington, USA)
Reinstwasseranlage	Arium 611	Sartorius AG (Göttingen, DE)
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Schüttler	Vortex-Schüttler	VWR International LLC. (Darmstadt, DE)
Zentrifuge	Micro Star 17 R	VWR International LLC. (Darmstadt, DE)
Eismaschine	Scotsman AF103	Hubbard Systems (Ipswich, UK)
pH-Meter	pH-Meter 605	Deutsche METROHM GmbH und Co. KG (Filderstadt, DE)
pH-Meter	pH-Meter HI 221 Calibration Check	HANNA Instruments (Kehl, DE)

Feinwaage	JL-180	Chymo Balance Corp. (Kyoto, JP)
-----------	--------	---------------------------------

## B.5. Software

**Tab. B.3.:** Verwendete Software.

Verwendung	Name	Hersteller
MST-Bindekurven	NT.Analysis	Nanotemper Technology GmbH (München, DE)
Microarray bedrucken	NPC16	GeSiM GmbH (Großerkmannsdorf, DE)
NanoDrop-Photometer	ND-1000 V3.8.1	NanoDrop Technologies Inc. (Wilmington, USA)
NanoDrop-Photometer	ND-3300 V2.8.0	NanoDrop Technologies Inc. (Wilmington, USA)
Microarray-Scanner	GenePix <sup>®</sup> Pro 6.0	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
Datenanalyse und Auswertung	OriginPro 2020	OriginLab <sup>®</sup> Corporation (Northampton, USA)

## B.6. Chemikalien und Reagenzien

**Tab. B.4.:** Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
25(OH)D	Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA)
Vitamin D (Cholecalciferol)	Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA)
Ethanol (EtOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
SYBR <sup>®</sup> Green I	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
SYBR <sup>®</sup> Green II	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)



Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
TWEEN®-20	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Humanserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)
Natriumborhydrid (NaBH <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE)

## B.7. Puffer und Lösungen

**Tab. B.5.:** Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Aptamerbindepuffer (BP/SP)	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 2 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM KCl 1 mM CaCl <sub>2</sub> pH 7,6 (10 % (v/v) Ethanol)*
Phosphate Buffered Saline (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
3 x SSC	300 mM NaCl 30 mM Natriumcitrat pH 7,0
TAE	40 mM Tris 1 mM EDTA 20 mM Essigsäure pH 8,5

## C. Methoden

### C.1. CD-Spektroskopie

Das VDBA14-Aptamer wurde in Aptamerbindepuffer auf eine Endkonzentration von  $10\text{ }\mu\text{M}$  verdünnt, 10 min bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt und dann 5 min auf Eis gelagert, um die Faltung des Aptamers zu gewährleisten. Das Zielmolekül 25(OH)D wurde mit einer finalen Konzentration von  $10\text{ }\mu\text{M}$  hinzugegeben, und die VDBA14-25(OH)D-Lösung wurde 24 h bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. CD-spektroskopische Messungen wurden anschließend mit einem JASCO J-1000 Spektrophotometer (JASCO, Tokio, JP) und einer Quarzküvette (optische Weglänge = 10 mm) durchgeführt. Die Spektren wurden durch die Akkumulation von drei Scans abgebildet (im Bereich von 200 nm bis 320 nm). Die Scan-Geschwindigkeit wurde auf  $50\text{ nm min}^{-1}$  eingestellt. Die Nulllinien wurden zuvor mit dem VDBA14 Bindepuffer aufgezeichnet.

### C.2. MST-Experimente

#### C.2.1. VDBA14-25(OH)D-Interaktion

Bindungskurven mit der Microscale Thermophoresis-Methode des Aptamers wurden mit einem Monolith NT.115 (NanoTemper, München, DE, Deutschland) aufgenommen. Es wurden Premium Kapillaren verwendet, um unspezifische Adsorptionen während der MST zu minimieren (NanoTemper, München, DE, Deutschland). Die Interaktion von VDBA14 und 25(OH)D wurde in dem Aptamerbindepuffer (mit 10 % (v/v) Ethanol) untersucht. Dazu wurde 25(OH)D ausgehend von einer Konzentration von  $10\text{ }\mu\text{M}$  verdünnt. Das 5'-Cy5-markierte VDBA14 wurde mit einer konstanten, finalen Konzentration von 10 nM zu jeder 25(OH)D-Verdünnungsstufe gegeben. Die Lösung wurde anschließend für 1 h bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert, um sicherzustellen, dass die Ausbildung des VDBA14-25(OH)D-Komplexes erfolgte. Die Lösung wurde dann in Premium Kapillaren (Nanotemper Technology GmbH, München, DE, Deutschland) überführt und im Monolith NT.115 vermessen. Ein weiterer Lauf erfolgte bei  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Aus drei individuellen MST-Experimenten wurde anschließend die Standardabweichung der Messpunkte berechnet, welche den Fehlerbalken entsprechen. Zur Datenanalyse wurde das Programm NT.Analysis Software (Nanotemper Technology GmbH, München, DE, Deutschland) verwendet. Die Kurven wurden mit dem  $K_d$ -Modell der Software gefittet. Die finale Bearbeitung erfolgte in Origin 2018 (OriginLab® Corporation, Northampton, MA, USA).

### C.2.2. VDBA14-25(OH)D-Interaktion in Humanserum

Bindungskurven mit der Microscale Thermophoresis-Methode des Aptamers wurden mit einem Monolith NT.115 (NanoTemper, München, DE, Deutschland) aufgenommen. Es wurden Premium Kapillaren verwendet, um unspezifische Adsorptionen während der MST zu minimieren (NanoTemper, München, DE, Deutschland). Die Interaktion von VDBA14 und 25(OH)D wurde in dem Aptamerbindepuffer (mit 10 % (v/v) Ethanol) mit 20 % Humanserum untersucht. Dazu wurde 25(OH)D ausgehend von einer Konzentration von 10  $\mu$ M verdünnt. Das 5'-Cy5-markierte VDBA14 wurde mit einer konstanten, finalen Konzentration von 10 nM zu jeder 25(OH)D-Verdünnungsstufe gegeben. Die Lösung wurde anschließend für 1 h bei 25 °C inkubiert, um sicherzustellen, dass die Ausbildung des VDBA14-25(OH)D-Komplexes erfolgte. Die Lösung wurde dann in Premium Kapillaren (Nanotemper Technology GmbH, München, DE, Deutschland) überführt und im Monolith NT.115 vermessen. Ein weiterer Lauf erfolgte bei 35 °C. Aus drei individuellen MST-Experimenten wurde anschließend die Standardabweichung der Messpunkte berechnet, welche den Fehlerbalken entsprechen. Zur Datenanalyse wurde das Programm NT.Analysis Software (Nanotemper Technology GmbH, München, DE, Deutschland) verwendet. Die Kurven wurden mit dem  $K_d$ -Modell der Software gefittet. Die finale Bearbeitung erfolgte in Origin 2018 (OriginLab<sup>®</sup> Corporation, Northampton, MA, USA).

### C.2.3. VDBA14-Oligonukleotid Hybridisierungen

Für die Überprüfung der VDBA14-Oligonukleotidhybridisierung wurde erneut ein MST-Experiment durchgeführt. Dafür wurden die drei komplementären Oligonukleotide O1-O3 im Bereich von 100 nM bis 0,05 nM seriell verdünnt (finale Konzentration). Anschließend wurden die verschiedenen Verdünnungsstufen mit 10 nM 5'-Cy5-markiertem VDBA14 (finale Konzentration) vermischt und für 1 h bei 25 °C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend in Premium Kapillaren (Nanotemper Technology GmbH, München, DE, Deutschland) überführt und die Hybridisierung bei 35 °C im Monolith NT.115 vermessen. Zur Datenanalyse wurde das Programm NT.Analysis Software (Nanotemper Technology GmbH, München, DE, Deutschland) verwendet. Die Kurven wurden mit dem  $K_d$ -Modell der Software gefittet. Die finale Bearbeitung erfolgte in Origin 2018 (OriginLab<sup>®</sup> Corporation, Northampton, MA, USA).

### C.2.4. TID-Assay

Für die Evaluation der Oligonukleotidverdrängung im TID-Assay wurde ein MST-Experiment durchgeführt. Dafür wurde wie in C.2.1 beschrieben eine Lösung des VDBA14-25(OH)D-Kom-

plexes hergestellt, wobei erneut 25(OH)D seriell in Aptamerpuffer mit 10 % (v/v) Ethanol verdünnt wurde. Anschließend wurde 10 nM des jeweiligen komplementären 5'-Cy5-markierten Oligonukleotids (finale Konzentration) zu der VDBA14-25(OH)D-Lösung gegeben. Es handelte sich somit um einen kompetitiven TID-Assay. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde die Lösung in Premium Kapillaren (Nanotemper Technology GmbH, München, DE, Deutschland) überführt und im Monolith NT.115 vermessen. Der MST-Lauf erfolgte bei 35 °C. Zur Datenanalyse wurde das Programm NT.Analysis Software (Nanotemper Technology GmbH, München, DE, Deutschland) verwendet. Die Kurven wurden mit dem  $K_d$ -Modell der Software gefittet. Die finale Bearbeitung erfolgte in Origin 2018 (OriginLab® Corporation, Northampton, MA, USA).

### C.3. Microarray-Experimente

#### C.3.1. Immobilisierung von VDBA14 auf der Microarrayoberfläche

Das 5-NH<sub>2</sub>-modifizierte Aptamer VDBA14 wurde mit Hilfe des Arrayer NanoPlotter NP2.1 (GeSiM GmbH, Großwerkmannsdorf, DE, Deutschland) auf aldehydmodifizierten Glasslides (PolyAn GmbH, Berlin, DE, Deutschland) immobilisiert. Dafür wurden sowohl 2D, als auch 3D-Glasslides verwendet. Je Aptamer-Spot wurden dafür sechs Tropfen von VDBA14 in 3x SSC Puffer (wenn nicht anders beschrieben) auf der Microarrayoberfläche platziert. Die folgenden Parameter wurden für den Spottingvorgang verwendet: Spannung 120 V, Frequenz 100 Hz. Das Spotting-Layout bestand aus 16 Blöcken mit 8 Replikaten jeder Aptamerkonzentration, wenn nicht anders angegeben. Nachdem die Aptamere auf der Oberfläche immobilisiert wurden, erfolgte die Inkubation des Chips in einer Kammer mit gesättigter NaCl-Lösung für 24 h. Nach Ablauf der Zeit wurde der Chip luftgetrocknet und dann in einer Blocklösung (0,1 g NaBH<sub>4</sub>, 30 mL Ethanol, 10 mL PBS-Puffer) schüttelnd (150 rpm) für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der Chip dreimal für 10 min mit VDBA14-Bindepuffer gewaschen, um überschüssige Blocklösung zu entfernen. Anschließend konnte der Chip für Microarrayexperimente verwendet werden.

#### C.3.2. SYBR Green I/II-Färbung

Nachdem das VDBA14-Aptamer wie in C.3.1 beschrieben auf der Microarrayoberfläche immobilisiert wurde, erfolgte anschließend die Anfärbung des Aptamers mittels SYBR® Green I/II. SYBR® I interkaliert mit dsDNA, wohingegen SYBR® II einzelsträngige DNA färbt. Da VDBA14 sowohl einzelsträngige, als auch doppelsträngige Regionen enthält, konnte mit dieser Lösung

das gesamte Aptamer angefärbt werden. Dafür wurde der Chip in eine 1:10.000 SYBR<sup>®</sup> Green I/II-Lösung (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gelegt (50 mL, 10 min) und dreimal mit dem Aptamerbindepuffer (50 mL, 3 min), gefolgt von Wasser (50 mL, 1 min) gewaschen. Der Chip wurde dann durch einen Luftstrom getrocknet. Anschließend wurde der Chip mit einem GenePix 4000B-Scanner (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, USA) gescannt und mit der GenePix Pro 6.0-Software (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, USA) ausgewertet. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden dann gegen die verwendete VDBA14-Konzentration in OriginPro 2020 (OriginLab<sup>®</sup> Corporation, Northampton, USA) aufgetragen.

### **C.3.3. Untersuchung der Aptamerfunktionalität nach Immobilisierung**

VDBA14 wurde, wie in C.3.1 angegeben, auf der Microarrayoberfläche immobilisiert. Anschließend wurde der Chip in Aptamerbindepuffer inkubiert (50 mL, 30 min), um eine korrekte Faltung des Aptamers zu gewährleisten. Eine 16-Well Microarrayhybridisierungskammer (SCHOTT Nexterion, Mainz, DE, Deutschland) wurde anschließend auf dem Chip montiert. 25(OH)D wurde anschließend seriell in Aptamerbindepuffer mit 10 % (v/v) Ethanol verdünnt (100  $\mu$ M bis 0,62  $\mu$ M final). Jede der Verdünnungsstufen wurde dann mit 100 nM 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotid (finale Konzentration) vermischt. 150  $\mu$ L der Lösung wurde dann in die Reaktionskammern gegeben. Der Chip wurde anschließend bei Raumtemperatur schüttelnd (150 rpm) für 1 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden zuerst die einzelnen Reaktionskammern dreimal mit Aptamerbindepuffer gewaschen (5 min, 150 rpm). Anschließend wurde der gesamte Chip in Aptamerbindepuffer für 5 min bei 150 rpm gewaschen. Der Chip wurde getrocknet und mit einem GenePix 4000B-Scanner (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, USA) gescannt und mit der GenePix Pro 6.0-Software (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, USA) ausgewertet. Die prozentuale Verdrängung des 5'-Cy5-markierten Oligonukleotids wurde dann, wie in C.4.2 beschrieben, berechnet. Die Microarrayexperimente wurden dreimal wiederholt und aus der Standardabweichung der Fluoreszenzintensität bzw. dem Standardfehler bei der Berechnung der Signaländerung die Fehlerbalken erstellt. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten/Verdrängungen wurden dann gegen die verwendete 25(OH)D-Konzentration in OriginPro 2020 (OriginLab<sup>®</sup> Corporation, Northampton, USA) aufgetragen.

### **C.3.4. Einfluss des Puffers auf die Immobilisierung**

Durch die Bestimmung der Fluoreszenzintensität bei der Verwendung von verschiedenen Puffern sollte der optimale Puffer für die VDBA14-Immobilisierung gefunden werden. Dafür wurde der Immobilisierungsvorgang wie in C.3.1 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde PBS-Puffer,

Aptamerbindepuffer und 3x SSC-Puffer während der Immobilisierung verwendet. Anschließend erfolgte die Anfärbung mittels SYBR<sup>®</sup> Green I/II wie in C.3.2 beschrieben. Die Fluoreszenzintensität wurde anschließend gegen den verwendeten Puffer und die VDBA14-Immobilisierungskonzentration in Origin 2020 aufgetragen (OriginLab<sup>®</sup> Corporation, Northampton, USA).

### **C.3.5. Einfluss der Spacerlänge auf die Immobilisierung**

Die Verwendung eines C6 und C12-Spacers, welcher sich als 5'-Modifikation an VDBA14 befindet, wurde in dieser Dissertation hinsichtlich der Immobilisierungseffizienz überprüft. Dafür wurde VDBA14 mit C6- und mit C12-Spacer synthetisiert (Integrated DNA Technologies, Sunnyvale, USA). Anschließend wurden vier VDBA14-Konzentrationen ausgehend von 25  $\mu$ M seriell verdünnt und auf der Microarrayoberfläche (PolyAn GmbH, Berlin, DE, Deutschland) wie in C.3.1 beschrieben immobilisiert. Anschließend folgte wie in C.3.2 die Anfärbung von VDBA14 mittels Fluoreszenzfarbstoff. Der Chip wurde getrocknet und mit einem GenePix 4000B-Scanner (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, USA) gescannt und mit der GenePix Pro 6.0-Software (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, USA) ausgewertet. Anschließend wurde das Experiment auf drei separaten Chips wiederholt und aus der Standardabweichung der Signalintensitäten die Fehlerbalken berechnet. Die finale Datenauswertung erfolgte in OriginPro 2020 (OriginLab<sup>®</sup> Corporation, Northampton, USA).

### **C.3.6. Einfluss der Spacerlänge auf die Verdrängung des Oligonukleotids**

Zur Bestimmung der Verdrängung bei der Verwendung der zwei Spacerlängen wurde erneut ein Microarrayexperiment durchgeführt. Dafür wurde VDBA14 mit C6- und mit C12-Spacer synthetisiert (Integrated DNA Technologies, Sunnyvale, USA). Anschließend wurden vier VDBA14-Konzentrationen ausgehend von 25  $\mu$ M seriell verdünnt und auf der Microarrayoberfläche (PolyAn GmbH, Berlin, DE, Deutschland) wie in C.3.1 beschrieben immobilisiert. Der Chip wurde dann in Aptamerbindepuffer inkubiert (50 mL, 30 min), um eine korrekte Faltung des Aptamers zu gewährleisten. Eine 16-Well Microarrayhybridisierungskammer (SCHOTT Nexterion, Mainz, DE, Deutschland) wurde anschließend auf dem Chip montiert, woraus sich 16 abgetrennte Reaktionskammern ergaben. 25(OH)D wurde in zwei Konzentrationen in Aptamerbindepuffer mit 10 % (v/v) Ethanol angesetzt (10  $\mu$ M und 0  $\mu$ M), welche als Positiv- und Negativkontrolle auf die Reaktionskammern aufgeteilt wurden. Durch die zwei zu überprüfenden Spacerlängen ergaben sich somit vier Reaktionskammern, in welchen TID-Reaktionen abliefen. 25(OH)D und 100 nM Oligonukleotid 2 (finale Konzentration) wurden anschließend ver-

mischt. 150  $\mu$ L des Gemisches wurden dann gleichzeitig in die Reaktionskammern gegeben. Der Chip wurde anschließend bei Raumtemperatur schüttelnd (150 rpm) für 1 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden zuerst die einzelnen Reaktionskammern dreimal mit Aptamerbindepuffer gewaschen (5 min, 150 rpm). Anschließend wurde der gesamte Chip in Aptamerbindepuffer für 5 min bei 150 rpm gewaschen. Der Chip wurde getrocknet und mit einem GenePix 4000B-Scanner (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, USA) gescannt und mit der GenePix Pro 6.0-Software (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, USA) ausgewertet. Die prozentuale Verdrängung des 5'-Cy5-markierten Oligonukleotids 2 wurde dann, wie in C.4.2 beschrieben, berechnet. Die Microarrayexperimente wurden dreimal wiederholt und aus der Standardabweichung des Standardfehlers bei der Berechnung der Signaländerung die Fehlerbalken erstellt. Die errechneten Signalanstiege wurden dann gegen die verwendete 25(OH)D-Konzentration in OriginPro 2020 (OriginLab<sup>®</sup> Corporation, Northampton, USA) aufgetragen.

### C.3.7. Einfluss des komplementären Oligonukleotids auf TID-Effektivität

Zur Überprüfung des optimalen Oligonukleotids für eine maximale Verdrängung im TID-Assay wurde zuvor 12,5  $\mu$ M und 6,25  $\mu$ M VDBA14 auf einer 3D-Aldehydoberfläche, wie in C.3.1 angegeben, in 3x SSC-Puffer immobilisiert. Anschließend wurde der Chip in Aptamerbindepuffer inkubiert (50 mL, 30 min), um eine korrekte Faltung des Aptamers zu gewährleisten. Eine 16-Well Microarrayhybridisierungskammer (SCHOTT Nexterion, Mainz, DE, Deutschland) wurde anschließend auf den Chip montiert. 25(OH)D wurde anschließend seriell in Aptamerbindepuffer mit 10 % (v/v) Ethanol verdünnt (von 10  $\mu$ M bis 0,62  $\mu$ M). Das verdünnte 25(OH)D wurde dann mit 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotid (finale Konzentration 100 nM) vermischt. 150  $\mu$ L der 25(OH)D-Oligonukleotid-Lösung wurden dann in die Reaktionskammern gegeben. Der Chip wurde anschließend bei Raumtemperatur schüttelnd (150 rpm) für 1 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden zuerst die einzelnen Reaktionskammern dreimal mit Aptamerbindepuffer gewaschen (5 min, 150 rpm). Anschließend wurde der gesamte Chip in Aptamerbindepuffer für 5 min bei 150 rpm gewaschen. Der Chip wurde getrocknet und mit einem GenePix 4000B-Scanner (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, USA) gescannt und mit der GenePix Pro 6.0-Software (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, USA) ausgewertet. Die prozentuale Verdrängung des 5'-Cy5-markierten Oligonukleotids wurde dann, wie in C.4.2 beschrieben, berechnet. Die Microarrayexperimente wurden dreimal wiederholt und aus dem Standardfehler bei der Berechnung der Signaländerung die Fehlerbalken erstellt. Die berechneten Verdrängungen der beiden Oligonukleotide wurden dann gegen die verwendete 25(OH)D-Konzentration in OriginPro 2020 (OriginLab<sup>®</sup> Corporation, Northampton, USA) aufgetragen.

### C.3.8. Einfluss der Inkubationsreihenfolge auf TID-Effektivität

Bei der Durchführung eines TID-Assays im Microarrayformat ergeben sich bei der Zugabe der verschiedenen Komponenten (25(OH)D und Oliognukleotid) drei mögliche Ansätze. Bei Ansatz 1 handelt es sich um einen kompetitiven Ansatz, bei dem beide Komponenten gleichzeitig in die Reaktionskammer eines Microarraychips gegeben werden. Bei Ansatz 2 wird zuerst 25(OH)D zu dem immobilisierten Aptamer in die Reaktionskammer gegeben. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wird der Überstand entfernt und der Chip gewaschen. Dann wird das 5'-Cy5-markierte Oligonukleotid hinzugegeben. Bei Ansatz 3 wird zuerst das komplementäre, markierte Oligonukleotid in die Reaktionskammer gegeben. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wird der Überstand entfernt und der Chip gewaschen. Dann wird 25(OH)D in die Reaktionskammern gegeben. Um den Einfluss der Inkubationsreihenfolge auf die Verdrängung des Oligonukleotids zu überprüfen, wurden die drei Ansätze in einem Microarrayexperiment evaluiert. Dafür wurde VDBA14 in fünf Dichten auf einem 3D-Aldehydchip, wie in C.3.1 angegeben, in 3x SSC-Puffer immobilisiert. Anschließend wurde der Chip in Aptamerbindepuffer inkubiert (50 mL, 30 min), um eine korrekte Faltung des Aptamers zu gewährleisten. Eine 16-Well Microarrayhybridisierungskammer (SCHOTT Nexterion, Mainz, DE, Deutschland) wurde anschließend auf den Chip montiert. Nun wurde für jeden der drei möglichen Ansätze ein TID-Assay durchgeführt. Für die Detektion einer maximalen Verdrängung wurde 1  $\mu$ M 25(OH)D in Aptamerbindepuffer mit 10 % (v/v) Ethanol verwendet und anschließend mit der TID-Reaktion bei 0  $\mu$ M 25(OH)D verglichen. Bei allen Ansätzen wurde 5'-Cy5-markiertes Oligonukleotid 2 mit einer finalen Konzentration von 100 nM verwendet. Bei Ansatz 1 wurden alle Komponenten gleichzeitig in die Kammern gegeben. Bei Ansatz 2 und 3 zuerst die oben genannten Komponenten. Nach Ablauf von 1 h wurde der Überstand in der Reaktionskammern entfernt und der gesamte Chip wurde mit Aptamerbindepuffer gewaschen, um ungebundene Komponenten abzuwaschen. Diese würden die Verdrängungsreaktion verfälschen. Anschließend erfolgte die Zugabe der verbliebenen Komponente (erneut 150  $\mu$ L) und der Chip wurde erneut für 1 h schüttelnd (150 rpm) inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden zuerst die einzelnen Reaktionskammern dreimal mit Aptamerbindepuffer gewaschen (5 min, 150 rpm). Anschließend wurde der gesamte Chip mit Aptamerbindepuffer für 5 min bei 150 rpm gewaschen. Der Chip wurde getrocknet und mit einem GenePix 4000B-Scanner (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, USA) gescannt und mit der GenePix Pro 6.0-Software (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, USA) ausgewertet. Die prozentuale Verdrängung des 5'-Cy5-markierten Oligonukleotids wurde dann, wie in C.4.2 beschrieben, berechnet. Die berechneten Verdrängungen für jeden Ansatz und VDBA14-Konzentration wurde anschließend in einer Tabelle beschrieben.



### C.3.9. Bestimmung der Sensitivität

Für die Bestimmung der Sensitivität des TID-Assays wurde ein Microarrayexperiment durchgeführt. 12,5  $\mu$ M VDBA14 wurde, wie in C.3.1 angegeben, auf der 3D-Microarrayoberfläche in 3x SSC-Puffer immobilisiert. Anschließend wurde der Microarraychip in Aptamerbindepuffer inkubiert (50 mL, 30 min), um eine korrekte Faltung des Aptamers zu gewährleisten. Eine 16-Well Microarrayhybridisierungskammer (SCHOTT Nexterion, Mainz, DE, Deutschland) wurde anschließend auf den Chip montiert. Das Target 25(OH)D wurde anschließend in Aptamerbindepuffer mit 10 % (v/v) Ethanol seriell verdünnt (48 nM bis 1,5 nM finale Konzentrationen). Jede Verdünnungsstufe wurde dann mit 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotid 2 vermischt (finale Konzentration 100 nM). 150  $\mu$ L der Lösung wurde dann in die Reaktionskammern gegeben. Der Chip wurde anschließend bei Raumtemperatur schüttelnd (150 rpm) für 1 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden zuerst die einzelnen Reaktionskammern dreimal mit Aptamerbindepuffer gewaschen (5 min, 150 rpm). Anschließend wurde der gesamte Chip in Aptamerbindepuffer für 5 min bei 150 rpm gewaschen. Der Chip wurde getrocknet und mit einem GenePix 4000B-Scanner (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, USA) gescannt und mit der GenePix Pro 6.0-Software (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, USA) ausgewertet. Anschließend wurde die Verdrängung mittels Formel C4.2. berechnet und gegen die jeweilige 25(OH)D-Konzentration aufgetragen. Durch ein lineares Fitting (OriginLab<sup>®</sup> Corporation, Northampton, USA) in dem Konzentrationsbereich von 1,5 nM bis 12 nM wurde anschließend die Steigung ermittelt, was der Sensitivität bei der Berechnung des LOD und LOQ-Wertes entspricht (siehe C.3.10).

### C.3.10. Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze, siehe (C.4.3). Dabei ergibt sich der jeweilige Wert aus der zehnfachen Standardabweichung eines Blanks (LOQ) bzw. der dreifachen Standardabweichung eines Blanks (LOD) geteilt durch die Sensitivität, welche in C.3.9 bestimmt wurde. Diese Bestimmung der Messgrenzen wurden basierend auf [100] durchgeführt.

## C.4. Berechnungen

### C.4.1. Berechnung SNR

Die Bestimmung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (Signal-To-Noise-Ratio, SNR) erfolgte mit der untenstehenden Formel. Dafür wurde zuvor die Standardabweichung des Hintergrundsi-

gnals bestimmt. Je höher der SNR-Wert, desto mehr hebt sich das detektierte Signal von dem Hintergrundrauschen der verwendeten Messmethode ab.

$$\text{SNR} = \frac{\text{Signal} - \text{Hintergrundsignal}}{\text{Standardabweichung Hintergrundsignal}}$$

### C.4.2. Berechnung Verdrängung

Für die Charakterisierung von TID-Assays ist die Verdrängung des komplementären, markierten Oligonukleotids eine wichtige Kennzahl zur Optimierung des Assays. Diese wird häufig prozentual angegeben und wird mit der unten stehenden Formel berechnet. Dabei wird die Fluoreszenzintensität bei der jeweiligen 25(OH)D-Konzentration (Relative Fluorescence Units, RFU<sub>c</sub>) mit dem RFU-Wert bei einer 25(OH)D-Konzentration von 0 in Relation gesetzt.

$$\text{Verdrängung (\%)} = 100\% - \left( \frac{\text{RFU}_c}{\text{RFU (0 } \mu\text{M 25(OH)D)}} \right) 100\%$$

### C.4.3. Berechnung LOQ, LOD

Für die Charakterisierung von Assays für die Detektion von kleinen Molekülen sind die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wichtige Kennzahlen. Die Berechnung dieser Grenzen erfolgt durch die Betrachtung der Standardabweichung von 10 individuellen Blanks (in diesem Fall entspricht der Blank einem Aptamerspot bei einem Microarray-Experiment ohne die Zugabe von 25(OH)D, aber mit Zugabe von 100 nM 5'-Cy5-markiertem Oligonukleotid (finale Konzentration). Weiterhin fließt die Sensitivität der verwendeten Methode in die Berechnung ein. Die Sensitivität des 25(OH)D-Microarrays wurde wie in C.3.9 beschrieben ermittelt. Mithilfe der unten stehenden Formeln wurden anschließend LOQ und LOD berechnet.

$$\text{LOQ} = \left( \frac{10\sigma_{\text{Blank}}}{S} \right)$$

$$\text{LOD} = \left( \frac{3\sigma_{\text{Blank}}}{S} \right)$$

## D. Abbildungsverzeichnis

3.1. Publikationen über die Grundlagenforschung und Detektion von kleinen Molekülen . . . . .	4
3.2. Biosynthese von Vitamin D im menschlichen Körper . . . . .	6
3.3. Aptasensor, welcher auf dem Sandwich-Design beruht . . . . .	11
3.4. Aptasensor, welcher auf der Target-induzierten Strukturveränderung beruht (TISS) . . . . .	11
3.5. Aptasensor, welcher auf der Target-induzierten Dissoziation beruht (TID) . . . . .	12
3.6. Aptasensor, welcher auf der kompetitiven Bindung beruht (CR) . . . . .	13
4.1. Charakterisierung der Aptamerstruktur mittels mFold und CD-Spektroskopie . . . . .	22
4.2. Literatur-CD-Spektren von verschiedenen Aptamertertiärstrukturen . . . . .	24
4.3. CD-Spektren der VDBA14 und 25(OH)D-Interaktion . . . . .	25
4.4. MST-Messung der Interaktion von VDBA14 und Target bei Raumtemperatur . . . . .	27
4.5. Simulierte Schmelzkurve von VDBA14 . . . . .	28
4.6. Simulation der Sekundärstruktur von VDBA14 bei verschiedenen Temperaturen . . . . .	29
4.7. MST-Messung der Interaktion von VDBA14 und dem Target 25(OH)D bei 35 °C . . . . .	30
4.8. MST-Messung der Interaktion von VDBA14, 25(OH)D und Vitamin D bei 35 °C . . . . .	32
4.9. MST-Messung der Aptamer-Oligonukleotid-Hybridisierungen . . . . .	35
4.10. Verdrängung der drei Oligonukleotide durch hohe 25(OH)D-Konzentrationen . . . . .	38
4.11. MST-Messung des TID-Assays mit drei Oligonukleotiden . . . . .	39
4.12. Schematischer Aufbau des Microarrays für die VDBA14-Immobilisierung . . . . .	42
4.13. Experimenteller Ablauf der VDBA14-Immobilisierung . . . . .	43
4.14. Bestimmung der idealen Immobilisierungsoberfläche im Microarrayformat . . . . .	45
4.15. Bestimmung der maximalen Immobilisierungskonzentration von VDBA14 . . . . .	46
4.16. Einfluss des Immobilisierungspuffers auf die Signalintensität der Fluoreszenz . . . . .	48
4.17. Aufbau des Microarraychips für die Überprüfung der Aptamerfunktionalität . . . . .	50
4.18. 25(OH)D-abhängige Signalintensität bei zwei VDBA14-Konzentrationen . . . . .	51
4.19. Kompetitiver TID-Assay bei zwei VDBA14-Konzentrationen . . . . .	53
4.20. Strukturformeln der verwendeten Aptamerlinker zur Immobilisierung . . . . .	55
4.21. Einfluss der Spacerlänge auf die Signalintensität . . . . .	56
4.22. Einfluss der Spacerlänge auf die Oligonukleotidverdrängung . . . . .	58
4.23. Einfluss von Oligonukleotid 2 und 3 auf die Verdrängung . . . . .	60
4.24. Änderung der Signalintensität durch 25(OH)D im nanomolaren Bereich . . . . .	67

4.25. Signal-zu-Rausch-Werte des TID-Assays . . . . .	68
4.26. TID-Assay in 20 % Humanserum . . . . .	70
4.27. Hypothetische Verwendung des Microarrays für Diagnostik . . . . .	72

## E. Tabellenverzeichnis

3.1. Aptasensoren für die Detektion von kleinen Molekülen. . . . .	14
3.2. Vergleich von Apta- und Immunosensoren für die Detektion von kleinen Molekülen	17
4.1. Analyse der VDBA14-Sequenz auf G-Quadruplexe . . . . .	21
4.2. Vergleich der Hybridisierungskennzahlen der drei Oligonukleotide . . . . .	36
4.3. Vergleich der drei Oligonukleotide im TID-Assay . . . . .	40
4.4. Vergleich der Sensitivität des TIDs bei 6,25 $\mu$ M und 12,5 $\mu$ M VDBA14 . . . . .	54
4.5. Sensitivität von O2 und O3 bei 6,25 $\mu$ M VDBA14 . . . . .	61
4.6. Sensitivität von O2 und O3 bei 12,5 $\mu$ M VDBA14 . . . . .	61
4.7. Einfluss der Inkubationsreihenfolge im TID-Assay . . . . .	63
4.8. Aus Vitamin D-Mangel resultierende Krankheitsbilder . . . . .	66
4.9. Vergleich eines kommerziellen 25(OH)D-Assays mit dem TID-Assay . . . . .	74
B.1. Verwendete Verbrauchsmaterialien. . . . .	91
B.2. Verwendete Laborgeräte. . . . .	92
B.3. Verwendete Software. . . . .	93
B.4. Verwendete Chemikalien und Reagenzien. . . . .	93
B.5. Verwendete Puffer und Lösungen. . . . .	94

## F. Unterstützende Arbeiten

In der vorliegenden Dissertation wurden Teile der praktischen Arbeiten in folgenden studentischen Abschlussarbeiten nach Planung und in Zusammenarbeit des Autors dieser Dissertation durchgeführt.

Maren Greve

- Bachelorarbeitstitel: Aptamer-basierte Detektion von 25-Hydroxy-Vitamin D
- Bearbeitungszeitraum: 06.03.2019 bis 08.05.2019
- Teilergebnisse in Unterkapitel 4.4.3

## G. Lebenslauf

### **Persönliche Angaben**

Name:	Marc Prante
Geburtsdatum und -Ort:	01.11.1993 in Sulingen
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### **Studium**

2017-heute	Promotionsstudium: Chemie an der Leibniz Universität Hannover am Institut für Technische Chemie
2015-2017	Abschluss: Doktor der Naturwissenschaften Masterstudium: Life Science an der Leibniz Universität Hannover
2012-2015	Abschluss: Master of Science Bachelorstudium: Life Science an der Leibniz Universität Hannover Abschluss: Bachelor of Science

### **Schulbildung**

2006-2012	Besuch des Gymnasium Sulingens in Sulingen Abschluss: Abitur
-----------	---

## H. Publikationen und Konferenzbeiträge

### Journal-Publikationen

Marc Prante (80 %), Christian Ude (10 %), Miriam Große, Lukas Raddatz, Ulrich Krings, Gernot John, Shimshon Belkin, Thomas Scheper (10 %): A Portable Biosensor for 2,4-Dinitrotoluene Vapors, *Sensors* (2018), 18(12):4247, *Research Article*. DOI: 10.3390/s18124247

Marc Prante (80 %), Torsten Schüling (5 %), Bernhard Roth, Kort Bremer, Johanna-Gabriela Walter (15 %): Characterization of an Aptamer Directed against 25-Hydroxyvitamin D for the Development of a Competitive Aptamer-Based Assay, *Biosensors* (2019), 9(4):134, *Research Article*. DOI: 10.3390/bios9040134

Marc Prante (85 %), Ester Segal, Thomas Scheper, Janina Bahnemann, Johanna-Gabriela Walter (15 %): Aptasensors for Point-of-Care Detection of Small Molecules, *Biosensors* (2020), 10(9):108, *Review*. DOI: 10.3390/bios10090108

### Internationale Vorträge

Marc Prante (80 %), Christian Ude (10 %), Miriam Große, Lukas Raddatz, Ulrich Krings, Gernot John, Shimshon Belkin, Thomas Scheper (10 %): A Portable Biosensor for 2,4-Dinitrotoluene Vapors, *2nd European Biosensor Symposium (EBS)*, Florenz (02/2019)